

**Molekulare und funktionelle
Charakterisierung des Adipokins
C1q/TNF-related protein-3
(CTRP-3)**



**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III –
Biologie und vorklinische Medizin der Universität Regensburg**

vorgelegt von
Andrea Kopp aus Regensburg
Februar 2011

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von September 2007 bis Februar 2011 in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg unter der Anleitung von Prof. Dr. med. Andreas Schäffler.

Promotionsgesuch eingereicht am 02.02.2011

Kolloquium am 25.03.2011

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender:	Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Wirth
	Erstgutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Charalampos Aslanidis
	Zweitgutachter:	Prof. Dr. med. Andreas Schäffler
	Dritter Prüfer:	Prof. Dr. med. Richard Warth

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	vii
1 Einleitung	1
1.1 Die Adipositas als Teil des metabolischen Syndroms	1
1.2 Das Fettgewebe	2
1.2.1 Aufbau des Fettgewebes und seiner Zellen	2
1.2.2 Das Fettgewebe als endokrines Organ	3
1.2.3 Adipositas und Entzündung – die Verbindung zum Immunsystem	4
1.3 Die C1q/TNF Proteinfamilie	7
1.3.1 Das Adipokin Adiponektin	8
1.3.2 Die <i>C1q/TNF-related protein</i> -Familie (CTRP)	10
1.3.3 CTRP-3	13
1.3.3.1 Identifizierung, Aufbau und Lokalisation	13
1.3.3.2 Expressionsmuster von CTRP-3	13
1.3.3.3 Die Funktionen von CTRP-3	14
1.3.3.3.1 CTRP-3 als Wachstumsfaktor	14
1.3.3.3.2 CTRP-3 in der Leber	14
1.3.3.3.3 CTRP-3 besitzt anti-inflammatorische Fähigkeiten	15
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3 Chemikalien	19
2.1.4 Kit-Systeme	21
2.1.5 Puffer und Lösungen	22
2.1.5.1 Lösungen für Arbeiten mit DNA	22
2.1.5.2 Lösungen für Arbeiten mit RNA	22
2.1.5.3 Lösungen für Arbeiten mit Proteinen	23

2.1.5.3.1	Lösungen für die Präparation von Proteinextrakten	23
2.1.5.3.2	Lösungen für SDS-PAGE	23
2.1.5.3.3	Lösungen zur Silberfärbung von Acrylamidgelen [98]	24
2.1.5.3.4	Lösungen für Western-Blotting	25
2.1.5.3.5	Lösungen für ELISAs	26
2.1.5.4	Lösungen für Oil Red O Färbung	27
2.1.5.5	Lösungen für die Isolierung primärer humaner Monozyten	27
2.1.6	Enzyme	27
2.1.7	Antikörper	28
2.1.7.1	Primäre Antikörper	28
2.1.7.2	Sekundäre Antikörper	28
2.1.8	Kulturmedien	29
2.1.8.1	Medien für eukaryotische Zellen	29
2.1.8.1.1	Medien für Insektenzellen	29
2.1.8.1.2	Medien für Säugerzellen	30
2.1.8.2	Medien für <i>E.coli</i>	30
2.1.8.3	Organismen	31
2.1.8.3.1	Eukaryotische Zellen	31
2.1.8.3.1.1	Insektenzellen	31
2.1.8.3.1.2	Zelllinien und humane Zellen	31
2.1.8.3.2	Bakterien	31
2.1.9	RNA	32
2.1.10	Plasmide	32
2.1.11	Oligonukleotide	32
2.1.11.1	Primer für die Klonierung	32
2.1.11.2	Primer für die Sequenzierung	32
2.1.11.3	Primer für die Amplifikation muriner Gene	33
2.1.11.4	Primer für LightCycler-Analysen	33
2.1.12	siRNA-Sequenzen	33
2.1.13	Humane Proteinextrakte	34
2.1.14	Humane Serumproben	34
2.1.15	Humane Peritonealflüssigkeit	34
2.2	Methoden	36
2.2.1	Kultivierung von Zellen	36

2.2.1.1	Kultivierung von <i>E.coli</i>	36
2.2.1.2	Kultivierung von Insektenzellen	36
2.2.1.3	Kultivierung der humanen Zelllinie THP-1	36
2.2.1.4	Kultivierung der murinen Zelllinie 3T3-L1	37
2.2.1.4.1	Differenzierung von 3T3-L1 Zellen zu Adipozyten	37
2.2.1.4.2	Stimulation von 3T3-L1 Zellen	38
2.2.1.5	Kultivierung von primären humanen Zellen	38
2.2.1.5.1	Kultivierung von primären humanen Adipozyten	38
2.2.1.5.2	Isolierung und Kultivierung von primären humanen Monozyten	38
2.2.2	Arbeiten mit DNA	39
2.2.2.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	39
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von DNA	40
2.2.2.3	Agarosegelelektrophorese	40
2.2.2.4	Reinigung von DNA	41
2.2.2.4.1	Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen	41
2.2.2.4.2	Reinigung von DNA aus Agarosegelen	41
2.2.2.5	Inkubation mit Restriktionsenzymen	41
2.2.2.6	Inkubation mit Alkalischer Phosphatase	41
2.2.2.7	Ligation	41
2.2.2.8	Klonierung mit Hilfe der Cre-Rekombinase	42
2.2.2.9	Transformation von <i>E.coli</i>	42
2.2.2.10	Polymerase Chain Reaction (PCR)	43
2.2.2.11	DNA-Sequenzierung	43
2.2.2.12	Real-Time RT-PCR	43
2.2.3	Arbeiten mit RNA	45
2.2.3.1	Isolierung von RNA aus Zellen	45
2.2.3.2	Konzentrationsbestimmung von RNA	46
2.2.3.3	Reverse Transkription	46
2.2.3.4	Transfektion mit siRNA	46
2.2.4	Arbeiten mit Proteinen	47
2.2.4.1	Präparation von Proteinextrakten	47
2.2.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	47
2.2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
2.2.4.4	Silberfärbung	48
2.2.4.5	Western-Blot	49

2.2.4.6	Coomassie-Färbung	50
2.2.4.7	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	50
2.2.4.8	Bestimmung des Zelltodes	50
2.2.4.9	Oil Red O Färbung	51
2.2.4.10	Untersuchungen mit TLR4/MD-2 Fusionsproteinen	51
2.2.4.10.1	Immunpräzipitation/LPS-Bindungsassay	52
2.2.4.10.2	LPS-Bindungs-ELISA	52
2.2.4.11	Glyzerolassay	52
2.2.4.12	Nachweis von intrazellulären Triglyceriden	53
2.2.5	Rekombinante Expression von CTRP-3 in H5 Insektenzellen	53
2.2.5.1	Expression rekombinanter Proteine im Bakulovirus Expressionssystem	53
2.2.5.2	Klonierung der CTRP-3 cDNA in den pLP-BacPak9 Expressionsvektor	54
2.2.5.3	Generierung rekombinanter Bakuloviren	54
2.2.5.4	Infektion von Insektenzellen	55
2.2.5.5	Reinigung des rekombinanten CTRP-3	56
2.2.6	Tierexperimente	57
2.2.7	Statistische Auswertungen	57
3	Ergebnisse	58
3.1	CTRP-3 - Expression und Funktion in Adipozyten	58
3.1.1	CTRP-3 Expression in Adipozyten	58
3.1.1.1	CTRP-3 Expression während der Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten	58
3.1.1.2	CTRP-3 Expression in humanen Adipozyten	60
3.1.1.2.1	CTRP-3 Expression in humanen Präadipozyten und reifen Adipozyten aus gesunden Spendern	61
3.1.1.2.2	CTRP-3 Expression in subkutanen und viszeralen Adipozyten in Abhängigkeit vom BMI	62
3.1.2	Stimulation von 3T3-L1 Adipozyten mit rekombinanten CTRP-3	62
3.1.2.1	Signaltransduktion von CTRP-3 in 3T3-L1 Adipozyten	63
3.1.2.2	Stimulation von 3T3-L1 Zellen mit CTRP-3 und die Auswirkung auf die Adipokin-Sekretion	64
3.1.3	Anti-inflammatorische Effekte von CTRP-3 in Adipozyten	65
3.1.3.1	Anti-inflammatorische Effekte in 3T3-L1 Adipozyten	65
3.1.3.2	Anti-inflammatorische Effekte in humanen Adipozyten	67
3.1.4	Knockdown von CTRP-3 in 3T3-L1 Adipozyten	68

3.1.4.1	Einfluss des Knockdown auf den zellulären Phänotyp	69
3.1.4.2	Einfluss des CTRP-3 Knockdown auf die Sekretion von Adipokinen und Zytokinen	70
3.1.4.3	Einfluss des CTRP-3 Knockdown auf den Lipidstoffwechsel und die Adipogenese	72
3.1.5	CTRP-3 in einem LPS-Entzündungsmodell in 3T3-L1 Adipozyten	75
3.1.6	CTRP-3 in der Infektion mit <i>Staphylococcus aureus</i>	77
3.1.7	Auswirkungen von Insulin auf die CTRP-3 Expression in 3T3-L1 Adipozyten	77
3.2	Expression und Funktion von CTRP-3 in Monozyten	78
3.2.1	CTRP-3 Expression in Monozyten	78
3.2.1.1	CTRP-3 in THP-1 Zellen und primären humanen Monozyten aus gesunden Spendern im Vergleich zu Adipozyten	78
3.2.1.2	Die Expression von CTRP-3 in humanen Monozyten von gesunden und diabetischen Spendern	79
3.2.2	Anti-inflammatorische Wirkung in humanen Monozyten	81
3.2.2.1	Anti-inflammatorische Wirkung in humanen Monozyten von gesunden Spendern	81
3.2.2.2	Anti-inflammatorische Rolle von CTRP-3 in Monozyten von gesunden Kontrollen vs. Typ 2 Diabetiker	84
3.3	CTRP-3 in humanem Serum von Kontrollpersonen vs. Typ 2 Diabetiker	86
3.4	CTRP-3 in Peritonealflüssigkeit von Patienten mit Aszites	87
3.5	CTRP-3 als LPS-Antagonist – Wechselwirkung mit TLR4	90
3.5.1	Der Einfluss von CTRP-3 auf die LPS-TLR4 Bindung	90
3.5.2	CTRP-3 und seine Interaktion mit LPS	92
3.6	CTRP-3 <i>in vivo</i>: ein Maus-SIRS-Modell	93
4	Diskussion	96
4.1	CTRP-3 als neuer Mediator eines Crosstalks zwischen Adipozyten und Monozyten	96
4.1.1	CTRP-3 - Expressionsmuster in Adipozyten	96
4.1.2	Adipogene Wirkung und Signaltransduktion in Adipozyten	97

4.1.3	CTRP-3 als anti-inflammatorischer Wirkstoff in Monozyten und Adipozyten	98
4.2	TLR4 als Schaltstelle für die Wirkung von CTRP-3	100
4.3	CTRP-3 und sein Zusammenhang mit T2DM, Adipositas und Entzündung	102
4.3.1	CTRP-3 Expression in Abhängigkeit von BMI und T2DM	102
4.3.2	Unterschiede in der Wirkung von CTRP-3 zwischen Kontrollpersonen und Typ 2 Diabetikern	103
4.3.3	CTRP-3 Down-Regulation in der Entzündung	103
4.4	CTRP-3 und seine Anwendung <i>in vivo</i>	105
5	Zusammenfassung	106
6	Publikationen und Kongressbeiträge	107
6.1	Publikationen	107
6.1.1	Erstautorenschaften	107
6.1.2	Koautorenschaften	108
6.2	Kongressbeiträge	109
6.2.1	Poster	109
6.2.2	Passive Teilnahme	110
7	Literaturverzeichnis	114

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AdipoR1	Adiponektinrezeptor 1
AdipoR2	Adiponektinrezeptor 2
AK	Antikörper
Akt	Protein Kinase B (PKB)
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
AMPK	<i>Adenosine 5' Monophosphate-Activated Protein Kinase</i>
AMV-RT	<i>Avian Myoblastosis Virus Reverse Transcriptase</i>
APM	Adiponektin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCA	Bicinchoninsäure (<i>Bicinchoninic Acid</i>)
BMI	Körpermassenindex (kg/m ²) (<i>Body Mass Index</i>)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
CCL3	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 3</i>
CCL4	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 4</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
C/EBP α	<i>CCAAT/enhancer Binding Protein alpha</i>
C/EBP β	<i>CCAAT/enhancer Binding Protein beta</i>
C/EBP δ	<i>CCAAT/enhancer Binding Protein delta</i>
Cp	<i>Crossing Point</i>
CRP	<i>C-Reactive Protein</i>
Csi	CTRP-3-siRNA
C-terminal	Carboxy-terminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTRP	<i>Clq/TNF related protein</i>
D	Typ 2 Diabetiker
Da	Dalton
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylen Pyrocarbonat
dNTP	Desoxyribonukleotid (N=A,T,G,C)
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E	Eluat
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK1	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 (p44)</i>
ERK2	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 (p42)</i>
et al.	Et alii (lat.: und andere)
EtBr	Ethidiumbromid

E _x	Extinktion bei Wellenlänge x
FAS	<i>Fatty Acid Synthase</i>
FABP4	<i>Fatty Acid-Binding Protein 4</i>
FFA	freie Fettsäure (<i>Free Fatty Acid</i>)
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GLUT 4	Glukosetransporter 4
Gly	Glyzin
h	Stunden
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
hm	human
HMW	<i>High Molecular Weight Form</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish Peroxidase</i>)
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin
IgG	Immunglobulin G
IKK	<i>Inhibitor of NF-κB Kinase</i>
IL	Interleukin
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
ip	intraperitoneal
iv	intravenös
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
K	Kontrolle
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Ksi	Kontroll-siRNA
LB	Luria-Broth
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LMW	<i>Low Molecular Weight Form</i>
loxP	<i>Locus of Crossing Over</i> im Genom des Bakteriophagen P1
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
mAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1 (CCL2)</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
min	Minuten
MIF	<i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>
MIP1α	<i>Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha</i>
MIP-2	<i>Macrophage Inflammatory Protein 2</i>
MMW	<i>Medium Molecular Weight Form</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NCS	<i>Newborn Calf Serum</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
N-terminal	Amino-terminal
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte

ORF	<i>Open Reading Frame</i>
pAK	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pam3Cys	Synthetisches tripalmitoyliertes Lipopeptid
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PBST	PBS mit Tween®20
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
Poly(I:C)	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
PPAR α	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha</i>
PPAR γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma</i>
Pref-1	<i>Preadipocyte Factor-1</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>Rounds Per Minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
s	Sekunden
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
sc	subkutanes Fettgewebe (<i>subcutaneous</i>)
SCD1	Stearoyl-CoA Desaturase 1
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
SIRS	<i>severe inflammatory response syndrome</i>
SREBP-1c	<i>Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i>
ss	einzelsträngig
st	Standard (1-kb DNA Molekulargewichtsleiter)
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Trispuffer (<i>Tris Buffered Saline</i>)
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin
TG	Triglyzerid
TNF α	<i>Tumour Necrosis Factor alpha</i>
Tris-NH ₃	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid
U	Unit
UCP-1	<i>uncoupling protein-1</i>
ÜN	über Nacht
uni	universe
UV	Ultraviolett
V	Volt
vis	viszerale Fettgewebe (<i>visceral</i>)
w/v	Volumenprozent (<i>Weight Per Volume</i>)

1 EINLEITUNG

1.1 Die Adipositas als Teil des metabolischen Syndroms

Qualitative und quantitative Fehlernährung sowie zunehmender Mangel an Bewegung prägen den Lebensstil der modernen Gesellschaft. Folge dieses Wandels ist die „Volkskrankheit“ Adipositas. Sie zählt inzwischen zu den fünf wichtigsten Gesundheitsproblemen weltweit [1].

Ab einem Body Mass Index (BMI) von $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ wird ein Mensch gemäß der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als adipös definiert. Der Anteil der übergewichtigen und adipösen Personen nimmt in den letzten Jahren bedenklich schnell zu. In Deutschland ist den Angaben der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) zufolge derzeit jeder fünfte Bundesbürger adipös. 66 % der Männer und 51 % der Frauen sind bereits übergewichtig (BMI 25,0 - 29,9 kg/m^2). Erschreckend ist die Entwicklung des Anteils an Kindern und Jugendlichen mit Adipositas: 16 % im Alter von 3 bis 17 Jahren sind übergewichtig; 6 % werden sogar als adipös eingestuft.

Hauptkennzeichen der Fettleibigkeit ist eine Vergrößerung der Fettgewebsmasse. Ursache hiervon ist eine Zunahme der Adipozytenzahl (Hyperplasie) sowie der Adipozytengröße (Hypertrophie) [2]. Diese morphologischen Veränderungen im Fettgewebe beruhen auf der gesundheitsschädlichen Kombination von Lebensstil, Umweltfaktoren und genetischen Faktoren.

Die übermäßige Anhäufung von Fett hat eine Funktionsstörung des Fettgewebes zur Folge; die aktuelle Forschung bezeichnet dies als primären Defekt der Adipositas und somit als Ursache für das Auftreten von Adipositas-assoziierten Begleit- und Folgeerkrankungen [3]. Das gemeinsame Auftreten mit weiteren klinischen Merkmalen wie Glukoseintoleranz oder Diabetes mellitus, Bluthochdruck und atherogene Dyslipidämie (erniedrigtes HDL-Cholesterin (HDL, *High Density Lipoprotein*), Hypertriglyceridämie) wird zusammengefasst unter dem Begriff des „metabolischen Syndroms“ [4]. Das Risiko für die Entwicklung metabolischer und kardiovaskulärer Erkrankungen wie Typ 2 Diabetes mellitus und Atherosklerose, aber auch bestimmter Krebs- und Immunerkrankungen, ist für Patienten mit diesem Syndrom stark erhöht [5].

1.2 Das Fettgewebe

1.2.1 Aufbau des Fettgewebes und seiner Zellen

Das Fettgewebe stellt ein heterogenes Organ dar. Die Verteilung über den ganzen Körper unterscheidet subkutanes und intra-abdominelles (viszerales) Fettgewebe sowie Struktur- oder Baufettgewebe. Des Weiteren differenziert man funktionell und morphologisch braunes und weißes Fettgewebe. Braunes Fettgewebe erzeugt über eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung Hitze anstatt ATP, ein Mechanismus, welcher über das UCP-1 (*uncoupling protein-1*) vermittelt wird [6]. Weißes Fettgewebe ist in der Lage Triglyzeride zu speichern und bei Bedarf Freie Fettsäuren (FFA, *free fatty acids*) freizusetzen [7]. Erwachsene besitzen kaum braune Fettgewebsdepots. Bei Neugeborenen ist es dagegen an Hals und Brust zu finden und verhilft durch zahlreiche Mitochondrien in den Zellen zur Aufrechterhaltung der Körperwärme. Das weiße Fettgewebe stellt Energie bereit und schützt die inneren Organe vor mechanischem Stress und Auskühlung [8].

Es herrscht ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Verteilung des Fettgewebes. Männer besitzen mehr viszerales Fett, während Frauen mehr subkutanes Fettgewebe aufweisen [9-11]. Dabei macht das viszerale Fett nur einen geringen Teil der Gesamtkörperfettmasse aus, bei Männern ca. 20 %, bei Frauen ca. 6 % [7]. Trotzdem nimmt das viszerale Fettgewebe die tragende Rolle in metabolischen Erkrankungen ein. Viszerale Fettgewebs-Explantate sezernieren wesentlich größere Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen [12]. Diese gelangen über die Portalvene direkt zur Leber und beeinflussen so deren Metabolismus [13].

Das Fettgewebe bildet eine funktionelle Einheit aus verschiedensten Zelltypen: neben reifen Adipozyten und deren Vorläuferzellen, den fibroblasten-ähnlichen Präadipozyten, finden sich im Fettgewebe auch Bindegewebszellen (Fibroblasten) und deren Matrix. Es beinhaltet des Weiteren Zellen der Blutgefäße (Endothelzellen und glatte Muskelzellen), Nervenfasern und Zellen des Immunsystems (Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten) sowie mesenchymale Stammzellen [14] (siehe Abb. 1). Die Gesamtheit all dieser nicht-adipozytären Zellen wird als stromavaskuläre Zellfraktion bezeichnet. Dieser variable Anteil der Zellen kann bis zu 50% der Zellen im Fettgewebe betragen [4].

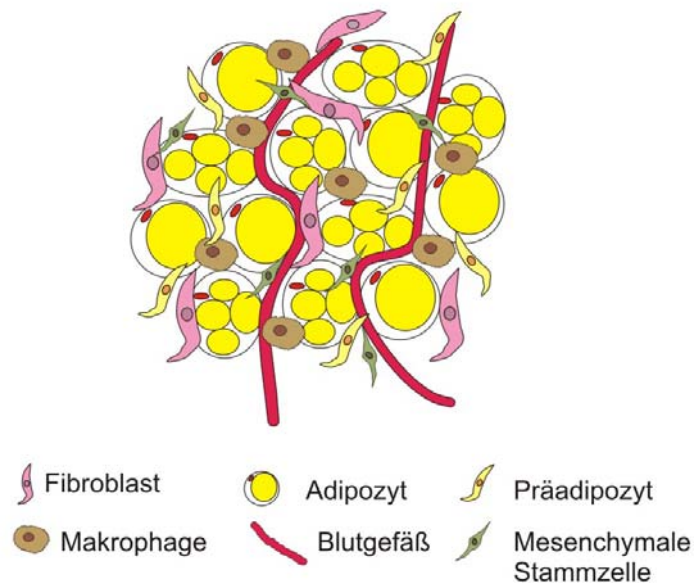


Abbildung 1: Zellulärer Aufbau des Fettgewebes.

1.2.2 Das Fettgewebe als endokrines Organ

Lange Zeit galt das Fettgewebe als träges Energiedepot und Speicherorgan für überschüssige Freie Fettsäuren in Form von Triglyzeriden. In den letzten Jahren jedoch hat sich die Vorstellung zur Rolle des Fettgewebes maßgeblich geändert [15]. Mit der Entdeckung der Adipozytokine (auch Adipokine), einer Gruppe von Hormonen und Proteinen, die spezifisch im Fettgewebe produziert und in die Blutbahn abgegeben werden, zeigte sich deutlich, dass es sich bei Fettgewebe um ein hochaktives und komplexes, endokrines Organ handelt [16]. Es verfügt somit über metabolische und endokrine Funktionen und gilt seither als das größte endokrine Organ des Körpers [3].

Die aus dem Fettgewebe in das Blut freigesetzten Adipozytokine agieren multifunktionell. Sie nehmen Einfluss auf Nahrungsaufnahme und deren Verwertung, regulieren Fortpflanzung, Insulinsensitivität, Blutdruck, greifen in immunologische Prozesse ein, haben aber auch autokrine und parakrine Bedeutung [7].

Die bekanntesten Adipokine sind das „Sättigungs-Hormon“ Leptin sowie das Protein Adiponektin. Leptin ist eines der wichtigsten Signalmoleküle zur Regulation der Nahrungsaufnahme und Energiehomöostase. Unabhängig davon verbessert Leptin peripher die Insulinsensitivität [17]. Adiponektin ist das vom Fettgewebe am stärksten sezernierte Protein. Anders als die meisten anderen Adipokine sind die Plasma-Adiponektin-Level in Adipositas- und Insulinresistenz-Modellen reduziert (siehe 1.3.1) [17-18].

Kommt es zu einer Akkumulation der Fettgewebsmasse, vor allem in Form einer übermäßigen Speicherung an viszeralem Fett, beeinflusst dies die funktionellen Prozesse in den Adipozyten [15]. Die Masse des Fettes ist abhängig von Zahl und Größe der Adipozyten. Der Gehalt an Lipiden pro Zelle ist jedoch limitiert. So können maximal bis zu 0,8 µg Lipide pro Zelle aufgenommen werden [4]. Im frühen Erwachsenenalter wird die Anzahl der Adipozyten festgelegt; Veränderungen in der Fettgewebsmasse nach dieser Zeit können sich somit nur auf die Zellgröße auswirken [15, 19]. Eine Vergrößerung der Adipozyten hat Einfluss auf sein Expressionsmuster. Eine Fehlregulation der Adipozyten hat schließlich eine fehlerhafte Sekretion der Adipokine zur Folge [7]. So verschiebt sich der Schwerpunkt der Sekretion weg von den anti-inflammatorischen hin zu den pro-inflammatorischen Faktoren [20]. Sowohl die Zytokin-Freisetzung, als auch die Lipolyse und somit die Sekretion von FFAs wird gesteigert [4, 21].

1.2.3 Adipositas und Entzündung – die Verbindung zum Immunsystem

Eine häufige Begleiterscheinung der Adipositas ist eine milde chronische Entzündung. Zahlreiche Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 (IL-1) und Tumor Nekrose Faktor (TNF) sowie Akute-Phase-Proteine wie CRP (*C-Reactive Protein*) sind bei einer Adipositas-Erkrankung erhöht [22-24]. Sogar die Leukozyten-Anzahl nimmt leicht zu [25]. Der Adipozyt selbst ist ein sehr komplexer Zelltyp, der einerseits Lipide synthetisiert und speichert und anti-inflammatorische Substanzen freisetzt, aber andererseits auch zur Sekretion pro-inflammatorischer oder chemotaktischer Faktoren (*Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1)) befähigt ist [4].

Gemäß dem Stand der momentanen Forschung führt die Anhäufung der Fettgewebsmasse zum einen direkt zu einer erhöhten Produktion an inflammatorischen Faktoren. Zum anderen kann durch die Rekrutierung von Monozyten in das Fettgewebe, die dort zu Makrophagen differenzieren und schließlich pro-inflammatorische Zytokine absondern, ein lokaler, sich selbst perpetuierender Entzündungszustand hervorgerufen werden [8]. Molekular ist die Rekrutierung von Monozyten in das Fettgewebe über Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) und MCP-1 vermittelt [26-28].

Der Nachweis von $\text{TNF}\alpha$ als Sezernierungsprodukt von Adipozyten diente als erster Hinweis für einen molekularen Link zwischen Inflammation und Adipositas [29]. Im Adipositas-Tiermodell konnte eine erhöhte Expression dieses inflammatorischen Zytokins nachgewiesen werden [30]. Mittlerweile sind zahlreiche pro-inflammatorische und

immunmodulierende Substanzen, die vom Fettgewebe gebildet werden, bekannt. Dies führte zur Betrachtung des Fettgewebes als Teil des angeborenen Immunsystems [31].

Der pro-inflammatorische Zustand in der Adipositas verursacht schließlich in den peripheren Geweben die Entstehung einer Insulinresistenz [21]. Auf molekularer Ebene hat ein Übermaß an inflammatorischen Zytokinen sowie der Überschuss an FFAs die Inhibierung des Insulin Signalweges *downstream* des Insulin-Rezeptors zur Folge [32]. Des Weiteren werden inflammatorische Signalwege auch durch metabolischen Stress aktiviert. So kann im Rahmen einer Adipositas-Erkrankung die Kapazität des Endoplasmatischen Reticulums (ER) ausgeschöpft werden. Dies schaltet Entzündungs-Signalwege wie die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) an und trägt wiederum zur Ausbildung einer Insulinresistenz bei [33]. Die durch einen erhöhten Glukose-Metabolismus und induzierte Fettsäureoxidation produzierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) treten hierbei als weiterer Faktor auf [34].

Diese Entzündungs- und Stress-Stimuli bedingen die Aktivierung von Serin/Threonin-Kinasen wie JNK, IKK β (*Inhibitor of NF- κ B Kinase*) und PKC (Proteinkinase C), die so zur Inhibierung des Insulin-Signalings beitragen [35] und die gleichermaßen im Rahmen der angeborenen Immunantwort angeschalten werden. Sie sind beteiligt am Toll-like Rezeptor-Signaling, das in Antwort auf LPS, doppelsträngige RNA, Peptidoglykane oder andere mikrobielle Produkte aktiviert wird [32]. Eben diese Kinasen stellen als Schaltstellen den Link zwischen Immunsystem und Metabolismus dar (siehe Abb. 2).

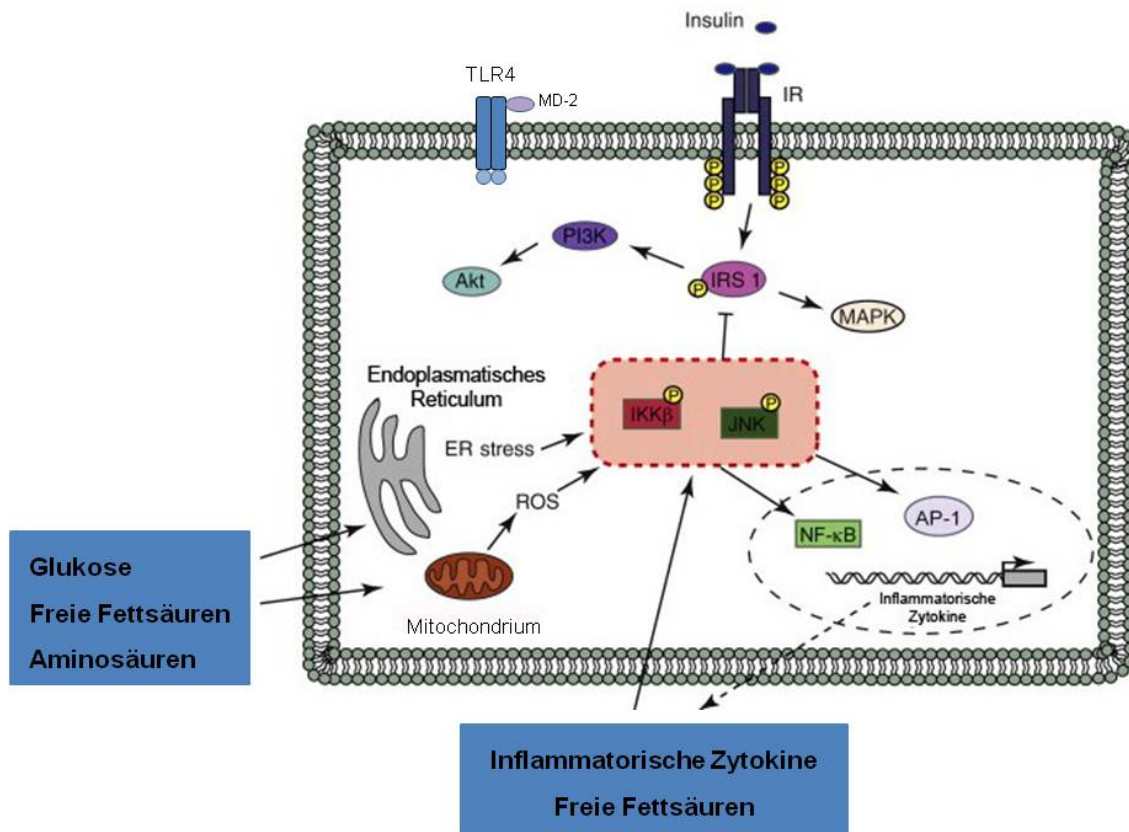


Abbildung 2: Modell der Überlappung von Signaltransduktionsmechanismen, die in Metabolismus und Entzündung involviert sind. Modifiziert nach [36].

Bereits kurz nach der Entdeckung der Toll-like Rezeptoren, die eine tragende Rolle im angeborenen Immunsystem einnehmen, erfolgte deren Expressionsnachweis auf Adipozyten [37-38]. Adipozyten können durch die Stimulation mit spezifischen TLR-Liganden zur Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine induziert werden [39]. Die Beteiligung von JNK und der MAP-Kinase ERK ließen sich in diesem Zusammenhang bestätigen [31]. Dabei sind es nicht nur die klassischen Stimuli von TLR4 wie LPS, sondern auch gesättigte Fettsäuren, die eine Aktivierung von TLR4 in Adipozyten verursachen [40-41] und somit über das TLR-Signaling zur Entstehung einer Insulinresistenz beitragen. Im Tiermodell schützt eine TLR4-Defizienz vor Diät-induzierter Adipositas [26, 42]. Zudem weisen Präadipozyten und Adipozyten aus *ob/ob* und *db/db* Mäusen eine höhere Toll-like Rezeptor-Expression (mRNA) als Wildtyp-Mäuse auf. Die Ergebnisse postulieren dabei einen starken Einfluss des Adipokins Leptin auf die TLR-Expression in Adipozyten [43]. Nach diesen Erkenntnissen kommt dem TLR-Signaling eine bedeutende Rolle in der Entwicklung der peripheren Insulinresistenz zu.

1.3 Die C1q/TNF Proteinfamilie

C1q stellt das Schlüsselprotein des klassischen Komplement-Systems dar und bildet den Link zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. Das 460 kDa schwere Protein (bestehend aus 18 Polypeptidketten) ist aus je sechs Untereinheiten A, B und C aufgebaut. Jede Untereinheit setzt sich aus einer kurzen N-terminalen Region und einer anschließenden Kollagendomäne zusammen. Sie zeichnet sich aber vor allem durch die C-terminale, globuläre Kopf-Domäne (gC1q-Domäne) aus, die es C1q ermöglicht, mit zahlreichen Liganden zu interagieren [44]. So bindet C1q über die gC1q-Domäne Antigen-gebundene Antikörper und löst die Komplementkaskade aus [45].

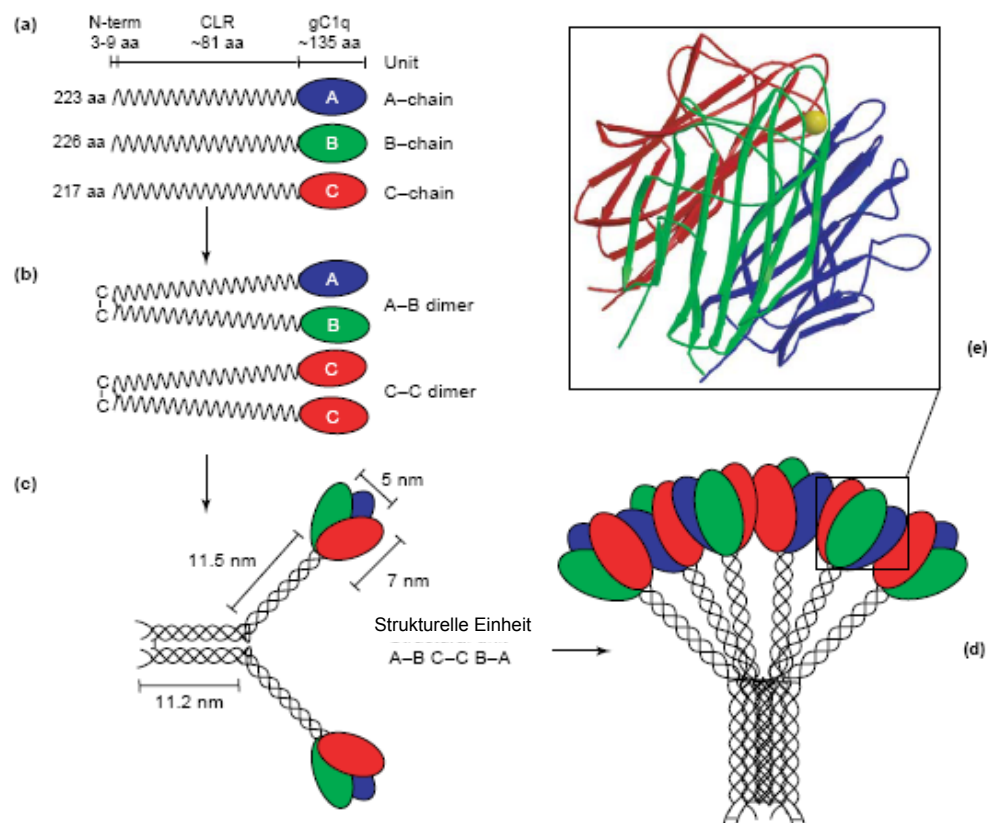


Abbildung 3: Strukturelle Organisation des C1q Moleküls. Modifiziert nach [44].

Diese globuläre Kopfdomäne stellt sich als ein Heterotrimer aus den Ketten A, B und C (siehe Abb. 3) dar. Die Forschung auf diesem Gebiet ergab, dass die C-terminale Komponente von C1q auch in vielen Nicht-Komplement-Proteinen wie bestimmten Kollagenisofomen sowie dem Adipokin Adiponektin (siehe 1.3.1) zu finden ist. Dies führte zu der Annahme, dass ein gemeinsames Vorläufermolekül für die verwandte Struktur

verantwortlich ist [46]. Die Untersuchung der Kristallstruktur von Adiponektin bzw. die Analyse seiner homotrimeren globulären C1q Domäne war ausschlaggebend für die Aufklärung der Struktur-Funktions-Beziehung von C1q Domänen und trug wesentlich zum Erkennen und Verständnis einer neuen Proteinfamilie bei. Strukturelle Homologien sowohl zur TNF-Familie als auch zur C1q-Komplement-Familie ließen sich im Rahmen dieser Arbeiten feststellen und postulierten daher die C1q/TNF-Superfamilie [47]. Die Homologien basieren auf identischer Faltstruktur (Ausbildung von β -Faltblättern mit identischer relativer Position und Länge der β -Stränge), Konservierung von wichtigen Aminosäuren (relevant für die Entstehung von Trimeren mit hydrophobem Kern), Ähnlichkeiten der Trimer-Verbindungsstücke sowie der genetischen Struktur (Intron-Positionen). Diese Merkmale sprachen für einen evolutionären Link zwischen der C1q- und der TNF-Proteinfamilie. Ihre Mitglieder werden als CTRPs, *C1q/TNF related proteins*, bezeichnet (siehe 1.3.2) und verfügen über ein breites Spektrum an Funktionen [47].

1.3.1 Das Adipokin Adiponektin

1995 und 1996 identifizierten vier unabhängige Arbeitsgruppen das Adipokin Adiponektin [48-51]. Es wird ausschließlich von reifen Adipozyten exprimiert und ins Serum sezerniert [51]. Die strukturelle Charakterisierung des Proteins (murin 247 AS, human 244 AS) lieferte folgenden Aufbau: N-terminal trägt es ein Signalpeptid, gefolgt von einer kurzen variablen Region. Kennzeichnend ist die Kollagendomäne, die aus 22 Glycin-X-Y Wiederholungen besteht und in der Lage ist eine Kollagen-Tripelhelix auszubilden. Vor allem die C-terminale globuläre Kopfdomäne gab Hinweise auf Homologien zu Kollagenen und dem Komplementfaktor C1q (siehe 1.3) [49].

Adiponektin wird im Serum sowohl als Homotrimer in der *Low Molecular Weight Form* (LMW), als Hexamer, bestehend aus zwei Homotrimeren in der *Medium Molecular Weight Form* (MMW) und als oligomere *High Molecular Weight Form* (HMW) detektiert. Letztere besteht aus vier bis sechs Homotrimeren (siehe Abb. 4). Die Ausbildung der Trimere erfolgt über die globuläre Domäne, während höhere Strukturen über die Ausbildung von Disulfidbrücken im Bereich der N-terminalen Region und der Kollagendomäne stabilisiert werden. Die verschiedenen Isoformen besitzen unterschiedliche biologische Aktivität und Funktion [52].

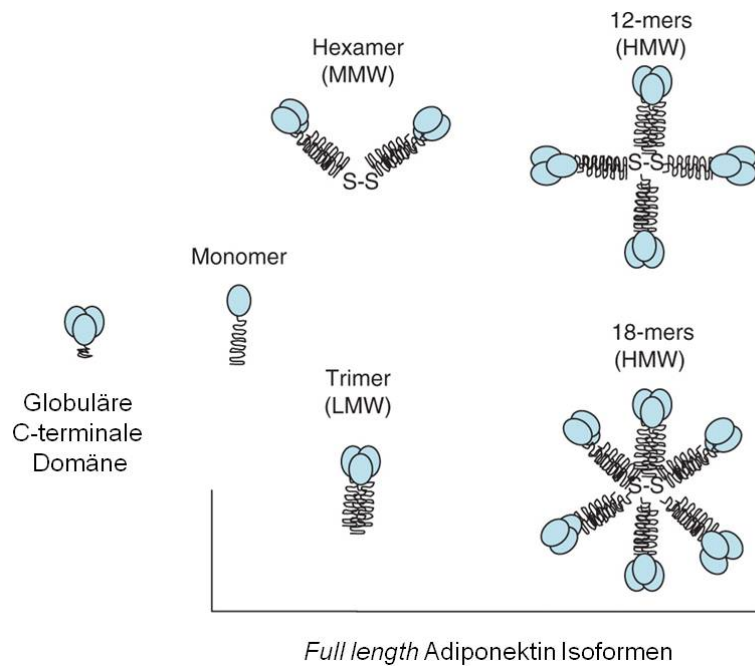


Abbildung 4: Darstellung der verschiedenen Isoformen von Adiponektin. Modifiziert nach [53].

Unter den bisher bekannten Adipokinen besitzt Adiponektin eine Sonderstellung. Es ist das einzige Adipokin, welches invers mit der Adipositas und der Insulinsensitivität korreliert [54-55]. Im Serum eines gesunden Erwachsenen finden sich Adiponektin-Konzentrationen zwischen 3 und 30 $\mu\text{g/ml}$ [56], immerhin 0,01 % des Serumgesamtproteins [57]. Bei Patienten mit Adipositas, metabolischem Syndrom oder Typ 2 Diabetes kommt es dagegen zu einer signifikanten Reduktion der Adiponektin Serum-Spiegel [54, 58].

Seine Expression wird während der Reifung der Adipozyten von *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma* ($\text{PPAR}\gamma$) induziert [59]. Die Rezeptoren von Adiponektin werden als AdipoR1 und R2 bezeichnet. Ein dritter Rezeptor, T-Cadherin, bindet lediglich das HMW Adiponektin und kommt nur in Endothel- und glatten Muskelzellen vor [60]. AdipoR1 und R2 werden dagegen auf Adipozyten [61], Hepatozyten, hepatischen Kupffer- und Sternzellen, pankreatischen β -Zellen und Makrophagen [62-64] exprimiert. Die Signaltransduktion verläuft nach Bindung an einen der beiden Rezeptoren über eine Aktivierung der *Adenosine 5' Monophosphate-Activated Protein Kinase* (AMPK) für AdipoR1 und *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha* ($\text{PPAR}\alpha$) für AdipoR2 [65] und bewirkt eine erhöhte Glukose-Aufnahme und Fettsäureoxidation in Skelettmuskel und Leber [66]. Dadurch nehmen die zirkulierenden FFAs ab, was eine Verbesserung des Insulin-Signalings und somit der Insulinsensitivität im Körper zur Folge hat [67].

Der Nachweis struktureller Homologien zu TNF α und C1q legte nahe, dass Adiponektin auch im Rahmen einer Entzündung eine wesentliche Rolle spielt. So ließen sich in verschiedenen Zelltypen anti-inflammatorische Fähigkeiten nachweisen [18]. Epidemiologische Untersuchungen zeigten eine inverse Assoziation zwischen Serum-Adiponektin-Spiegeln und inflammatorischen Markern [68-69]. Im Maus-Modell einer alkoholischen und nicht-alkoholischen Fettleber-Erkrankung bewirkt Adiponektin eine Reduktion der Steatose in der Leber [70]. In Adiponektin-defizienten Mäusen führt die Gabe von Tetrachlorkohlenstoff zu einer stärkeren Leber-Fibrosierung als in Wildtyp-Mäusen [71], während die adenoviral-vermittelte Expression von Adiponektin in diesen Tieren die Fibrosierung wieder verbessert. In humanen Studien zeigt sich ebenso die hepatoprotektive Eigenschaft von Adiponektin. In gesunden Probanden korrelieren die Serum-Adiponektin-Level negativ mit den Level der Leber-Enzyme Alanin- bzw. Aspartat-Aminotransferasen [72]. Eine andere Untersuchung zeigte in Patienten mit Steatohepatitis geringere Adiponektin-Serum-Spiegel als in Patienten mit Steatose [73].

Adiponektin beeinflusst in seiner Wirkung direkt Monozyten/Makrophagen, Endothelzellen, Leber- und Muskelzellen [57]. Von Bedeutung waren dabei die Arbeiten von Yokota *et al.*, die nachweisen konnten, dass Adiponektin die inflammatorische Antwort über zwei Mechanismen negativ reguliert: Inhibition der Proliferation von Makrophagen-Vorläuferzellen und Suppression der Makrophagen-Funktion. So ist das Adipokin in der Lage ist, die Phagozytose-Fähigkeit von Makrophagen zu inhibieren und eine LPS-induzierte TNF α -Sekretion zu reprimieren [74]. Daneben hemmt Adiponektin die TNF α -induzierte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen über die Inhibition des NF κ B-Signalings [75].

1.3.2 Die C1q/TNF-related protein-Familie (CTRP)

Wong *et al.* konnten im Jahre 2004 eine neue Proteinfamilie von Adiponektin-Paralogen beschreiben: die *C1q/TNF-related proteins* (CTRP) [76]. Proteine dieser Familie besitzen die strukturelle Organisation von Adiponektin und sind somit klar in vier definierte Domänen untergliedert (N-terminales Signalpeptid, variable Region, Kollagen-Domäne und C-terminale, globuläre Kopfdomäne). Die charakteristische C1q Kopfdomäne führt zur Einreihung der CTRPs in die C1q/TNF Familie.

Im Rahmen der durchgeführten Analysen wurden zunächst sechs CTRPs (CTRP-1 bis -3, CTRP-5 bis -7) beschrieben. Mittlerweile zählt die Familie zehn Mitglieder (CTRP-4, CTRP-8, -9 und -10), die nach und nach in ihrer Expression und Funktion charakterisiert

werden konnten. Während CTRP-1, -2, -3, -5 und -7 sehr stark im Fettgewebe exprimiert sind, ist CTRP-8 hauptsächlich in Lunge und Hoden zu finden. CTRP-6 und -10 werden dagegen vor allem in der Plazenta und im Auge detektiert [77].

Die CTRP-1 Expression ist im Fettgewebe von adipösen Zucker-Ratten (*fa/fa*) und *db/db*-Mäusen, die jeweils einen Defekt im Leptin-Rezeptor tragen, stark erhöht [78]. Zudem ist bekannt, dass pro-inflammatorische Zytokine wie TNF α und IL-1 β die CTRP-1 Expression im Fettgewebe induzieren [78]. In der Nebennierenrinde stimuliert es die Aldosteron-Produktion [79].

CTRP-2 und CTRP-5 aktivieren in Muskelzellen, ähnlich wie Adiponektin, AMPK und induzieren dadurch die Glykogen-Akkumulation sowie die Fettsäureoxidation [76, 80]. CTRP-5 wird analog zu CTRP-1 im Serum von diabetischen und adipösen Tieren vermehrt detektiert [80].

Eine anti-inflammatorische Rolle konnte kürzlich für CTRP-6 nachgewiesen werden. So ist es in der Lage, in Makrophagen die Expression von IL-10 zu induzieren. Verantwortlich hierfür ist vermutlich eine Aktivierung der *Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2* (ERK1/2) [81]. Die Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass CTRP-6 möglicherweise eine kompensatorische Rolle in Bezug auf Adiponektin einnimmt. Dies beruht auf der Beobachtung, dass in Adiponektin-null Mäusen erhöhte Mengen an CTRP-6 gefunden werden. Außerdem wirkt es ebenfalls über die Aktivierung von AMPK auf den Fettsäuremetabolismus ein [82]. Die größte Ähnlichkeit zu Adiponektin besitzt CTRP-9 mit einer Aminosäuresequenz-Homologie von 51 % bei der globulären Domäne. Die Hauptquelle für CTRP-9 ist ebenfalls das Fettgewebe. Außerdem lassen sich bei Frauen höhere Serumspiegel detektieren als bei Männern [83].

Tabelle 1 fasst die Funktion und Expression der einzelnen CTRPs nochmals zusammen.

C1q/TNF-related proteins (CTRPs)			
CTRP	Funktion	Expression	Heterooligomere mit
CTRP-1	Induktion der Aldosteron-Produktion	Nebennierenrinde Fettgewebe	CTRP-6
CTRP-2	Induktion der Glykogen-Akkumulation und Fettsäureoxidation in Muskelzellen	Fettgewebe	CTRP-7 Adiponektin
CTRP-3	Wachstumsfaktor und anti-inflammatorische Rolle in Monozyten	Fettgewebe	-
CTRP-4	?	?	-
CTRP-5	Induktion der Glykogen-Akkumulation und Fettsäureoxidation	Fettgewebe	-
CTRP-6	Anti-inflammatorische Rolle in Makrophagen	Plazenta, Auge	CTRP-1
CTRP-7	?	Fettgewebe	CTRP-2
CTRP-8	?	Lunge, Hoden	-
CTRP-9	Überexpression erniedrigt Serum-Glukose in <i>ob/ob</i> Mäusen	Fettgewebe	Adiponektin
CTRP-10	?	Plazenta, Auge	-

Tabelle 1: Übersicht über Expression, Funktion und Heterooligomer-Bildung der CTRPs.

Die CTRPs stellen eine hochkonservierte Proteinfamilie dar. Vergleicht man murine und humane CTRPs, so weisen sie für die N-terminale Region eine Aminosäure-Homologie zwischen 53-100% auf und für die C-terminale, globuläre Domäne liegt die Sequenzidentität sogar zwischen 82 und 99% [76]. Diese starke Konservierung lässt auf wichtige funktionelle Eigenschaften der CTRPs schließen.

In der Grundstruktur liegen alle CTRPs als Trimere vor, jedoch sind einige Vertreter in der Lage Homooligomere zu bilden. Weiterhin formen bestimmte CTRPs Heterooligomere miteinander oder auch mit LMW Adiponektin [77].

1.3.3 CTRP-3

1.3.3.1 Identifizierung, Aufbau und Lokalisation

Erstmals beschrieben wurde CTRP-3 im Jahr 2001 - damals bezeichnet als CORS-26 (*Collagenous Repeat-containing Sequence of 26 kDa Protein*). Bei Untersuchungen zur Skelettentwicklung stieß man auf ein neues Gen, das für ein sekretorisches Protein kodiert [84]. Das humane Gen für CTRP-3 ist auf Chromosom 5p13 lokalisiert. Es ist aus 6 Exons und 5 Introns aufgebaut [85]. Eine Analyse der Aminosäure-Sequenz (246 AS), die eine Kollagen-Region im N-terminalen Bereich und eine globuläre Domäne am C-Terminus aufzeigte, machte die Ähnlichkeit zu Komplementfaktor C1q und Adiponektin deutlich. Daher wurde es später in die Familie der *C1q/TNF-related proteins* eingereiht [86]. Die Kollagendomäne besteht aus 21 (human) bzw. 23 (murin) Glycin-X-Y Wiederholungen, die für die Ausbildung der Kollagentripelhelix verantwortlich sind.



Abbildung 5: Schematische Darstellung von CTRP-3. Signalpeptid (S), Variable Region (V), Kollagen-Domäne (K) mit typischer Aminosäure-Abfolge Glyzin-X-Y und Globuläre Kopfdomäne (G).

Das Vorhandensein eines Signalpeptids sowie seine hydrophilen Eigenschaften untermauerten die These, dass es sich bei CTRP-3 um ein sekretorisches Protein handelt.

1.3.3.2 Expressionsmuster von CTRP-3

Die ersten Untersuchungen zu CTRP-3 erfolgten in Mäusen. Hier konnte eine Expression in Knorpel und Niere gezeigt werden [84]. Aufgrund seines erstmaligen Nachweises im Knorpel wurde CTRP-3 auch als Cartducin bzw. Cartonectin (cartilage = Knorpel) bezeichnet [86-87].

Es zeigte sich, dass CTRP-3 ausschließlich in der proliferativen Zone der Knorpel-Wachstumsfuge zu finden ist. Hierbei war auffällig, dass CTRP-3 in Prä-Chondrozyten, und proliferierenden Chondrozyten, aber nicht in reifen Chondrozyten detektierbar ist. Auf der Grundlage dieser Beobachtung wurde zunächst eine wichtige Rolle in der Skelettentwicklung postuliert [84, 86]. Im Gegensatz zu Chondrozyten wird die Expression von CTRP-3 auf mRNA Ebene während der Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten stark induziert und konnte in synovialen Adipozyten des Knies detektiert werden [88]. Der erste

Nachweis humaner CTRP-3 mRNA erfolgte in Kolon, Dünndarm, weißem Fettgewebe und Plazenta [85]. Weitere Gewebeanalysen auf Proteinebene zeigten CTRP-3 in humaner Lunge, Leber und Milz exprimiert [89]. In humanem Serum wird CTRP-3 als HMW-Komplex nachgewiesen [90]. Zirkulierendes CTRP-3 wurde in erhöhten Mengen in *ob/ob* Mäusen detektiert. Dagegen war der CTRP-3-Serumspiegel in Wildtyp-Tieren (C57BL/6-Mäuse) nach Hochfett-Diät erniedrigt [91].

1.3.3.3 Die Funktionen von CTRP-3

1.3.3.3.1 CTRP-3 als Wachstumsfaktor

Die Behandlung mit rekombinantem CTRP-3 identifizierte es als Wachstumsfaktor in unterschiedlichen Zelltypen. Eine Stimulation von chondrogenen Vorläuferzellen und Chondrozyten führt zur Förderung der Zellproliferation und Migration. CTRP-3 ist folglich an der Chondrogenese und Knorpelentwicklung beteiligt und wirkt dabei über eine Aktivierung von ERK1/2 und des *Phosphoinositol-3-Kinase/Akt*-Signalweges [86, 92].

Auch Endothelzellen und vaskuläre glatte Muskelzellen proliferieren und migrieren nach CTRP-3 Behandlung vermehrt, was zusätzlich für eine Rolle von CTRP-3 in der Angiogenese spricht. Dieser Prozess läuft über eine Aktivierung der Signalwege der ERK1/2 und der *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38 MAPK) ab [93-94].

Osteosarkom-Zelllinien zeigten eine erhöhte Expression von CTRP-3 auf mRNA und Proteinebene im Vergleich zu Osteoblasten. Eine Stimulation mit rekombinantem CTRP-3 führte zu vermehrtem Wachstum der Tumorzellen, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Migration. Wiederum wurde eine Beteiligung von ERK1/2 an diesem Prozess aufgezeigt [95].

1.3.3.3.2 CTRP-3 in der Leber

Erste *in vivo* Analysen wurden kürzlich an Mäusen durchgeführt. Die Untersuchungen deuteten darauf hin, dass CTRP-3 die Regulation der hepatischen Glukose-Freisetzung beeinflusst. Die intraperitoneale Gabe von rekombinantem CTRP-3 hatte einen Blutzucker-senkenden Effekt, der scheinbar Insulin-unabhängig ist. Dabei wirkt CTRP-3 über eine Suppression der Glukoneogenese, was über eine Aktivierung von Akt und ERK1/2 in der Leber vermittelt wird. Auch in Zellkultur von Hepatozyten konnten diese Effekte verifiziert werden [91].

1.3.3.3.3 CTRP-3 besitzt anti-inflammatorische Fähigkeiten

In der monozytären Zelllinie THP-1 und in primären humanen Monozyten wurden erste anti-inflammatorische Fähigkeiten von CTRP-3 nachgewiesen. Die Zellen wurden dabei mit LPS behandelt und zeigten nach Gabe von CTRP-3 eine verminderte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF α und IL-6. Der Effekt wurde durch eine reduzierte Translokation von NF κ B p65 in den Zellkern erklärt [89].

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, durch eine weitere funktionelle Charakterisierung von CTRP-3 einen tieferen Einblick in die physiologische Rolle dieses neuen Adipokins zu erhalten. Dabei steht die anti-inflammatorische Wirkung von CTRP-3 im Fokus der Untersuchungen.

Basierend auf der Tatsache, dass es sich bei CTRP-3 um ein Adiponektin-paraloges Adipozytokin handelt, sind weitreichende Effekte von anti-inflammatorischer und anti-proliferativer Relevanz denkbar. Daraus ergeben sich unmittelbar mögliche klinische Implikationen dieses neuen Adipokins bei der Regulation von inflammatorischen Prozessen. So weisen Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus nicht nur eine gestörte Immunregulation, sondern auch eine vermehrte pro-inflammatorische Aktivität im Serum auf [96]. Zudem ist die Funktion der Monozyten verändert [96]. Deshalb ist es möglich, dass CTRP-3 als regulierendes Adipozytokin ursächlich an diesen Prozessen beteiligt ist.

Der in Monozyten bereits nachgewiesene Zytokin-reprimierende Effekt von CTRP-3 nach LPS-Gabe soll an monozytären Zellen von Typ 2 Diabetikern untersucht und die Unterschiede in der Wirkung von CTRP-3 in diesem Krankheitsbild im Vergleich zu Kontrollen dargestellt werden.

Ferner interessiert die autokrine und parakrine Wirkung von CTRP-3 auf Adipozyten. Sowohl die durch CTRP-3 angeschaltete Signaltransduktion, als auch seine anti-inflammatorische Fähigkeit soll an diesem Zelltyp untersucht werden. Ausgangsbasis ist dabei der in den letzten Jahren zunehmend gezeigte Cross-Talk zwischen Adipozyt und Monozyt, eine Achse, die besonders im viszeralen Fettgewebe eine Rolle spielt.

Bei den Untersuchungen wird besonderes Augenmerk auf die Rolle von Toll-like Rezeptor 4 gelegt. Er vermittelt als einer der wichtigsten und bestuntersuchten Rezeptoren des angeborenen Immunsystems mit seiner Bindung von bakteriellem Lipopolysaccharid die immunregulatorischen Signalwege [36].

Expressionsanalysen sollen den Einfluss von BMI und Krankheitsbild des Diabetes auf die CTRP-3 Proteinexpression in Monozyten und Adipozyten darstellen. In Peritonealflüssigkeit aus Patienten mit Aszites wird erstmals die Expression von CTRP-3 überprüft.

Die aus der Arbeit entstandenen *in vitro* und *ex vivo* Erkenntnisse sollen schließlich auch *in vivo* getestet werden. So ist es Ziel der Arbeit die Relevanz der immunmodulierenden Wirkung von CTRP-3 erstmals in einem murinen SIRS-Modell (*severe inflammatory response syndrome*) zu untersuchen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agarosegelkammer (12 x 14 cm) und Zubehör	Bio-Rad
Agarosegelkammer (7 x 15 cm) und Zubehör	Bio-Rad
Analysenwaage ISO 9001	Sartorius
Autoklav Varioklav Dampfsterilisator	H + P
Automixer II Plus	Kodak
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik
ELISA-Reader	BIO-TEK Instruments GmbH
Entwickler M35 X-Omat Prozessor	Kodak
Erdgasbrenner	Bochem
Flüssigstickstoffanlage ESPACE 600	AIR LIQUIDE Karyotechnik
Geldokumentation BDA digital mit UV Star 30	Biometra
Geltrockner	Biometra
Inkubationsschrank 27° Celsius	Heraeus Instruments
Inkubationsschrank 37° Celsius, 5% CO ₂	Heraeus Instruments
Inkubationsschrank mit Umlaufschüttler SI 500	Stuart
LightCycler® LC Karussell Zentrifuge	Roche
LightCycler® Real-Time RT-PCR Gerät LC2 mit Zubehör	Roche
Magnetrührer MR 3000 D	Heidolph
Magnetrührer/Heizplatte MR 3001 K	Heidolph
Magnetrührer/Heizplatte basic 2	IKH
Mikroskop DM IL und Zubehör	Leica
Mikroskop Axiovert 40 C und Zubehör	Zeiss
Mikrowellengerät 7015	Privileg
Milli-DI	Millipore
PCR Cycler T-Gradient Thermocycler	Biometra
pH-Meter pH210 Microprozessor	HANNA Instruments
Pipettensatz	Eppendorf
Power Supply Power Pac basic	Bio-Rad
Power Supply Power Pac 200	Bio-Rad
Schüttelgerät Rotamax 120	Heidolph
SDS-Gelapparatur Minigel und Zubehör	Bio-Rad
SDS-Gelplatten und Zubehör	Bio-Rad
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments
Speed-Vac Alpha RVC	Christ
Sterilisator WTC	Binder
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Thermomixer Compact	Eppendorf

Tischzentrifuge 5424
 Tischzentrifuge Biofuge fresco
 Trans-Blot Cell Transferkammer
 Ultraschallgerät mit Power Supply
 UV/Vis Photometer Ultraspec 2000
 UV-Flächenstrahler TFX-20 M
 Vakuumpumpe BCV 21
 Vortex VTX-3000L
 Wasserbad
 X-Ray Filmkassette (24 x 30 cm)
 Zellzählkammer, Tiefe 0,1 mm
 Zentrifuge Biofuge Stratos
 Zentrifuge Megafuge 1.0R

Eppendorf
 Heraeus Instruments
 Bio-Rad
 Bandelin
 Pharmacia
 MWG-Biotech
 Vacubrand
 LMS
 GFL
 Siemens
 Neubauer
 Heraeus Instruments
 Heraeus Instruments

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Dialyseschlauch (29 mm)
 EDTA Monovette Serumröhrchen
 ELISA-Platte (96 Loch)
 Gel Blotting Papier
 Handee™ Mini-Spin Säulchen
 Hyperfilm ECL™
 Immun-Blot™ PVDF Membran (0,2 µm)
 Konische Röhrchen (15 ml, 50 ml)
 LightCycler® Kapillaren (20 µl)
 MACS CD14 Micro Beads
 MACS LS magnetische Separationssäulen
 Maxisorp™ 96-well Platten
 Parafilm
 Petrischalen (10 x 1,5 cm)
 Petrischalen (15 x 1,5 cm)
 Pipettenspitzen
 Pipettenspitzen
 Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml)
 Rundfilterpapiere (ø 15 cm)
 Serologische Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25ml, 50ml)
 Shanddon Coverplate Objektträgerhalterungen
 Slide-A-Lyzer® Dialyse Kassetten
 Slide-A-Lyzer® Mini Dialyse Einheiten
 Sterile Einmalspritzen
 Sterile Filter-Spitzen (10 µl, 1250 µl)
 Sterile Filter-Spitzen (100 µl, 200 µl)
 Sterile Kanülen

Serva
 Sarstedt
 Corning Costar®
 Schleicher & Schuell BioScience
 Pierce
 Amersham Biosciences
 Bio-Rad
 BD Falcon
 Roche
 Miltenyi Biotec
 Miltenyi Biotec
 Nunc™
 American National Can™
 BD Falcon
 BD Falcon
 Eppendorf
 Sarstedt
 Eppendorf
 Macherey-Nagel
 Corning Costar®
 Thermo
 Pierce
 Pierce
 BD Plastipak
 Sarstedt
 Biozym Diagnostik
 BD Microlance™

Sterilfilter (0,22 µm Porengröße)	Nalgene®
Vacutainer™ CPT™ (8 ml)	BD
Vakuum Sterilfiltrationssystem (50 ml, 150 ml, 250 ml)	Millipore
Whatman Filterpapier	VWR
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Sarstedt
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-Loch)	Sarstedt
Zellkulturschalen (10 x 2 cm)	BD Falcon
Zellschaber	Sarstedt

2.1.3 Chemikalien

1-kb DNA Molekulargewichtsleiter	Invitrogen
2-Propanol	Merck
Acrylamid/Bisacrylamidlösung (30%)	Bio-Rad
Ampicillin	Ratiopharm
apo-Transferrin	Sigma
APS	Bio-Rad
Ascorbat	Sigma
BacPak™ Complete Medium	BD Biosciences
Bacto™ Agar	BD Biosciences
Biosafe™ Coomassie	Bio-Rad
Biotin	Sigma
Biotin-LPS (<i>E.coli</i> serotype 0111:B4)	InvivoGen
Bromphenolblau	Sigma
BSA, Fraktion V	Sigma
BSA, Fraktion V	Biomol
BSA, Fraktion V, fettsäurefrei	Roche
Chloramphenicol	Sigma
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Corticosteron	Sigma
DEPC	Fluka
Desoxycholate	Sigma
Difco™ LB Agar, Miller	BD Biosciences
Difco™ LB Broth, Miller	BD Biosciences
Dithiothreitol (DTT)	Bio-Rad
DMEM (4,5g/l Glukose)	Biochrom AG
Epinephrin	Sigma
Essigsäure (99%).	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Merck
EDTA	Merck
Express Five® SFM Medium	Gibco
Fenofibrat	Sigma

Fetuin	MP
Formaldehydlösung (37%)	Merck
FCS	Biochrom AG
Full Bereich Rainbow™ Proteinstandard	Amersham Biosciences
Glyzerol-Standard	Sigma
Glyzerin	Merck
Glyzin	Merck
HEPES	Sigma
IBMX	Serva
Igepal	Sigma
Imidazol	Sigma
Insulin, bovines	Sigma
Kanamycin	Sigma
Laurinsäure	Sigma
L-Glutamin (200 mM)	Gibco
LPS (<i>E.coli</i> serotype 055:B5)	Sigma
LPS (<i>E.coli</i> serotype 0111:B4)	Sigma
Magermilchpulver	Vitalia
β-Mercaptoethanol	Sigma
Metformin	Calbiochem
Methanol, technisch	Chemikalienausgabe
Natriumazid	Fluka
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Calbiochem
Natriumhydrogencarbonat	Merck
NCS	Sigma
NCS	Biochrom
Nukleasefreies Wasser	Promega
NuSieve® 3:1 Agarose	Cambrex
Oil Red O	Sigma
Pantothensäure	Sigma
PBS Dulbecco	Biochrom AG
Penicillin-Streptomycin-Lösung	PAN
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche
RPMI 1640	Biochrom AG
S.O.C. Medium	Invitrogen
Salzsäure rauchend	Merck
Schwefelsäure rauchend	Merck
SDS	Merck
SeaKem® GTG® Agarose	Cambrex
SeaKem® LE Agarose	FMC BioProducts
Sf900 II SFM Medium	Gibco
Silbernitrat	Merck
Streptavidin Sepharose™ High Performance	GE Healthcare

Sucrose	Sigma
TEMED	Merck
Tris-NH ₃	Merck
Tris-HCl	Merck
Triton X-100	Sigma
TRIzol	Invitrogen
Trypsin/EDTA	Gibco
Tween® 20	Sigma
Xylencyanol	Merck
Xylol	Merck

2.1.4 Kit-Systeme

Nachfolgend sind die Bezugsfirmen aller in dieser Arbeit verwendeten Kit-Systeme aufgeführt.

BCA Protein Assay Kit	Pierce
BacPAK™ Baculovirus Expressions-System	BD Biosciences
BD TALON™ Buffer Kit	BD Biosciences
BD TALON™ Purification Kit	BD Biosciences
BD Creator™ DNA Cloning Kit	BD Biosciences
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche
DryEase® Mini-Gel Drying System	Invitrogen
DuoSet® ELISA Development System human CCL3/MIP1 α	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human CCL4	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human CCL5	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human IL-6	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human MCP-1	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human MIF	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human TNF α	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System mouse CXCL2/MIP-2	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System mouse IL-6	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System mouse Adiponektin	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System mouse Resistin	R&D Systems
ECL Plus Western-Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences
ELISA MAX™ Standard Set Mouse MCP-1	Biolegend
Free Glycerol Assay Kit	BioCat
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick® Gel Extraction Mini Elute Kit	Qiagen
QIAquick® PCR Purification Mini Elute Kit	Qiagen
Reverse Transcription System	Promega
RNAlater RNA Stabilization Reagent	Qiagen
RNeasy® Mini Kit	Qiagen

Streptavidin-HRP	R&D Systems
Substrate Reagent Pack	R&D Systems
Toll-like Receptors Ligands Set	Axxora
Triglyceride GPO-PAP, Halbmikro-Test	Roche
X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent	Roche

2.1.5 Puffer und Lösungen

Im Folgenden wird die Zusammensetzung sämtlicher selbst hergestellten Puffer und Lösungen aufgeführt. Sofern nicht anders angegeben wurden diese bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

2.1.5.1 Lösungen für Arbeiten mit DNA

Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE-Puffer), 5-fach:

Tris-NH ₃	54	g
Borsäure	27,5	g
EDTA	4,65	g
	ad 1	l ddH ₂ O

Gelladepuffer, 10-fach:

Glyzerin (87%)	5,8	ml
Bromphenolblau	0,025	g
Xylencyanol	0,025	g
	ad 10	ml 0,5 M EDTA-Stammlösung pH 8,0

Der Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt.

2.1.5.2 Lösungen für Arbeiten mit RNA

DEPC-Wasser:

DEPC	1,0	ml
	ad 1	l ddH ₂ O

Die Lösung wurde nach Zugabe des DEPC kräftig geschüttelt, über Nacht bei RT belassen und am nächsten Tag autoklaviert.

Ethanol 75%:

Ethanol	75	ml
DEPC-Wasser	25	ml

2.1.5.3 Lösungen für Arbeiten mit Proteinen

2.1.5.3.1 Lösungen für die Präparation von Proteinextrakten

RIPA-Lysepuffer:

NaCl, 3 M Stammlösung	2,5	ml
Igepal	500	µl
Desoxycholate	0,25	g
SDS, 20%ige Stammlösung	250	µl
Tris, 1 M Stammlösung pH 7,5	2,5	ml
	ad 50	ml ddH ₂ O

Vor Gebrauch wurden dem Lysepuffer je eine entsprechende Menge Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail und PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail frisch zugesetzt. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C aufbewahrt.

2.1.5.3.2 Lösungen für SDS-PAGE

SDS-Probenpuffer (2x Lämmli), 2-fach [97]

Glyzerin (87%)	2	ml
Tris-HCl, 1 M Stammlösung pH 6,8	120	µl
SDS, 20%ige Stammlösung	2	ml
β-Mercaptoethanol	1	ml
Bromphenolblau	0,025	g
	ad 10	ml ddH ₂ O

Der 2x SDS-Probenpuffer wurde stets im Verhältnis 1:1 mit dem jeweiligen Probenlysat vermischt.

SDS-Probenpuffer (5x Lämmli), 5-fach [97]

Glyzerin (87%)	5	ml
Tris-HCl, 1 M Stammlösung pH 6,8	600	µl
SDS, 20%ige Stammlösung	2	ml
β-Mercaptoethanol	2,5	ml
Bromphenolblau	0,025	g
	ad 10	ml ddH ₂ O

Das Mischverhältnis zwischen 5x SDS-Probenpuffer und jeweiligem Probenlysat betrug 1:4.

SDS-Gellaufpuffer, 10-fach:

Glyzin	144	g
Tris-NH ₃	30	g
SDS, 20%ige Stammlösung	50	ml
	ad 1	l ddH ₂ O

Lösung für 12,5 %ige Trenngele:

30% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	40	ml
Tris-HCl, 1,5 M Stammlösung pH 8,8	25	ml
SDS, 10 %ige Stammlösung	1	ml
ddH ₂ O	34	ml

Lösung für 10%ige Trenngele:

30% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	33	ml
Tris-HCl, 1,5 M Stammlösung pH 8,8	25	ml
SDS, 10 %ige Stammlösung	1	ml
ddH ₂ O	41	ml

Lösung für 4,5 %ige Sammelgele:

30% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	13	ml
Tris-HCl, 0,5 M Stammlösung pH 6,8	25	ml
SDS, 10 %ige Stammlösung	1	ml
ddH ₂ O	61	ml

Die Aufbewahrung der Acrylamidlösungen fand bei 4°C statt. Unmittelbar vor Gebrauch wurde der Acrylamidlösung 10 %ige APS-Lösung im Verhältnis 1:200 und TEMED im Verhältnis 1:250 zugegeben.

2.1.5.3.3 Lösungen zur Silberfärbung von Acrylamidgelen [98]**Fixierlösung:**

Methanol	400	ml
Essigsäure (99%)	100	ml
	ad 1	l ddH ₂ O

Inkubationslösung:

Ethanol	300	ml
NaAc x 3 H ₂ O	68	g
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	2	g
	ad 1	l ddH ₂ O

Die Herstellung der Gebrauchslösung erfolgte durch Versetzen von 50 ml Inkubationslösung mit 130 µl Glutardialdehyd.

Silberlösung:

AgNO ₃	0,1	g
	ad 100	ml ddH ₂ O

Vor Gebrauch wurden 50 ml Silberlösung mit 10 µl Formaldehyd versetzt.

Entwicklerlösung:

Na ₂ CO ₃	5	g
	ad 100	ml ddH ₂ O

Unmittelbar vor Gebrauch wurden 50 ml Entwicklerlösung mit 5 µl Formaldehyd versetzt.

Stopplösung:

EDTA	14,6	g
	ad 100	ml ddH ₂ O

2.1.5.3.4 Lösungen für Western-Blotting

Tank-Puffer, 10-fach [99]:

Glyzin	140	g
Tris-NH ₃	30	g
SDS	5	g
	ad 1	l ddH ₂ O

Wet-Transfer-Puffer:

Methanol (technisch)	200	ml
Tank-Puffer, 10-fach	80	ml
	ad 1	l ddH ₂ O

PBST:

Tween® 20	1	ml
	ad 1	l PBS

TBS, pH 7,6, 10-fach:

Tris-NH ₃	24,2	g
NaCl	80	g
	ad 1	l ddH ₂ O

Die pH-Einstellung des Puffers erfolgte mit konzentrierter Salzsäure.

TBS:

TBS, pH 7,6, 10-fach	100	ml
	ad 1	l ddH ₂ O

TBST:

Tween® 20	1	ml
	ad 1	l TBS

Blockierlösung PBST:

Magermilchpulver	5	g
	ad 100	ml PBST

Blockierlösung TBST:

Magermilchpulver	5	g
	ad 100	ml TBST

Die Blockierlösungen ließen sich bei 4°C für 1-2 Tage aufbewahren.

Antikörperlösungen:**BSA-PBST:**

BSA	7,5	g
Natriumazid	0,5	g
Tween® 20	0,5	ml
	ad 0,5	l PBS

BSA-TBST:

BSA	7,5	g
Natriumazid	0,5	g
Tween® 20	0,5	ml
	ad 0,5	l TBS

Nach Sterilfiltration konnten die Lösungen bei 4°C aufbewahrt werden. Die Verdünnung der primären Antikörper in diesen Lösungen betrug in der Regel 1:1000.

2.1.5.3.5 Lösungen für ELISAs**Waschpuffer:**

Tween® 20	0,5	ml
	ad 1	l PBS

Reagent Diluent:

BSA	1	g
	ad 100	ml PBS

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

Substratlösung:

Die Lösungen A und B (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) des *Substrate Reagent Pack* von R&D Systems wurden vor Zugabe im Verhältnis 1:1 vermengt.

Stopplösung:

Schwefelsäure rauchend	5,7	ml
	ad 50	ml ddH ₂ O

Verdünnung des Standards, der Antikörper und des HRP-Streptavidin-Konjugats:

Dem Protokoll des Herstellers folgend wurde der Standard in Reagent Diluent, Capture AK in PBS, Detection AK und HRP-Streptavidin-Konjugat in Reagent Diluent verdünnt.

Verdünnung der Proben:

Die Proben wurden gemäß Herstellerprotokoll in Reagent Diluent verdünnt.

2.1.5.4 Lösungen für Oil Red O Färbung**Oil Red O Stammlösung:**

Oil Red O	0,175	g
	ad 50	ml 2-Propanol

Die Substanz wurde über Nacht bei 37°C unter Rühren gelöst, anschließend filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

Oil Red O Färbelösung:

Oil Red O Stammlösung	9	ml
ddH ₂ O	6	ml

Die Herstellung und anschließende Filtration der Lösung fand erst unmittelbar vor Gebrauch statt.

Fixierungs-Lösungen:

10% Formaldehyd in PBS
60% 2-Propanol in PBS

2.1.5.5 Lösungen für die Isolierung primärer humaner Monozyten**CD14 Beads Puffer:**

BSA	0,5	g
EDTA, 0,5 M Stammlösung pH 8,0	2	ml
	ad 0,5	l PBS

Der CD14 Beads Puffer wurde sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

2.1.6 Enzyme

Alkalische Phosphatase (Shrimp)	Roche
Cre Rekombinase	BD Biosciences Clontech
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes
Restriktionsenzym <i>Bam</i> H I	Roche
Restriktionsenzym <i>Xba</i> I	Roche
T4 DNA Ligase	Metabion
Taq DNA Polymerase	Roche

2.1.7 Antikörper

Im Folgenden sind die Bezugsfirmen aller in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sowie die Spezies, aus der die Antikörper isoliert wurden, aufgeführt.

2.1.7.1 Primäre Antikörper

Anti-6xHN pAK	Kaninchen	BD Biosciences
Anti- β -Aktin pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-AMPK α pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-ATGL pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-Adiponektin pAK	Ziege	R&D Systems
Anti-Akt (pan) mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-C/EBP α	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-CORS26 pAK	Ziege	R&D Systems
Anti-CORS26 pAK	Kaninchen	Pineda Antikörpersevice
Anti-CTRP3 pAK	Kaninchen	Abcam
Anti-FABP4 pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-FAS pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-FLAG (M2) mAK	Maus	Sigma
Anti-GAPDH mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-NF- κ B	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-Perilipin pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-p38 MAP Kinase pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-p44/42 MAPK mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-PI3 Kinase p85 pAK	Kaninchen	Upstate
Anti-PPARgamma mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-Phospho-Akt (Ser473) mAK	Kaninchen	Cell Signaling Laboratories
Anti-Phospho-AMPK α (Thr172) pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) mAK	Kaninchen	Cell Signaling Laboratories
Anti-Phospho-NF- κ B p65 (Ser536) mAK	Maus	Cell Signaling Laboratories
Anti-Phospho-p44/42 MAPK mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-Pref-1 pAK	Kaninchen	Chemicon International
Anti-SCD1 pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies

2.1.7.2 Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen HRP-konjugierter AK	Esel	Jackson Immuno Research
Anti-Maus HRP-konjugierter AK	Ziege	Jackson Immuno Research
Anti-Ziege HRP-konjugierter AK	Kaninchen	Jackson Immuno Research
Anti-Huhn HRP-konjugierter AK	Ziege	Jackson Immuno Research

2.1.8 Kulturmedien

2.1.8.1 Medien für eukaryotische Zellen

2.1.8.1.1 Medien für Insektenzellen

Medium	Supplementation
Express Five™ SFM (H5)	200 mM L-Glutamin 200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin
Sf900-Medium II SFM (Sf21)	200 mM L-Glutamin 200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin
Sf900-Medium II SFM (Sf21)	10% FCS 200 mM L-Glutamin 200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin
BacPak™ Complete Medium (Sf21)	-

2.1.8.1.2 Medien für Säugerzellen

Medium	Supplementation
RPMI 1640 (THP-1)	10% FCS 200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin
RPMI 1640 (primäre Monozyten)	10% autologes Serum
DMEM (3T3-L1) (Anzuchtmedium)	10% NCS 200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin
DMEM/Ham's F-12 (3T3-L1) (Differenzierungsmedium I)	5% NCS 17 nM Pantothersäure 10 nM Biotin 2 ng/ml apo-Transferrin 30 ng/ml Fetuin 1 µM Corticosteron (frisch zugesetzt) 200 µM Ascorbat (frisch zugesetzt) 2,5 µM IBMX (frisch zugesetzt) 100 nM Insulin (frisch zugesetzt) 200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin
DMEM/Ham's F-12 (3T3-L1) (Differenzierungsmedium II)	1 µM Insulin (frisch zugesetzt) 200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin
DMEM/Ham's F-12 (3T3-L1) (Kultivierungsmedium)	200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin
PM-1 (primäre humane Präadipozyten)	-
DM-2 (primäre humane Präadipozyten)	-
AM-1 (primäre humane Präadipozyten)	-

2.1.8.2 Medien für *E.coli*

Die Kultivierung von *E.coli* erfolgte in Luria-Broth-Flüssigmedium (LB-Medium) bzw. auf Luria-Broth-Agarplatten (LB-Agar).

LB-Medium:	25	g Luria-Broth-Base
	ad 1	l ddH ₂ O

LB-Agar:	25	g Luria-Broth-Agar
	ad 1	l ddH ₂ O

Um plasmidtragende Klone zu selektieren, wurden dem LB-Medium bzw. dem LB-Agar nach dem Autoklavieren entsprechende Antibiotika und Sucrose zugesetzt. Die Stammlösungen für Ampicillin, Kanamycin (je in ddH₂O) und Chloramphenicol (in Ethanol) wurden im Verhältnis 1:1000 mit dem Medium bzw. dem Agar vermischt. Im Medium betrug die Endkonzentration 100 µg/ml für Ampicillin, 50 µg/ml für Kanamycin und 30 µg/ml für Chloramphenicol sowie 7 % (w/v) für Sucrose.

2.1.8.3 Organismen

2.1.8.3.1 Eukaryotische Zellen

2.1.8.3.1.1 Insektenzellen

Die Kultivierung der verwendeten Insektenzelllinien H5 und Sf21 erfolgte in einem Brutschrank bei einer konstanten Temperatur von 27°C.

Zelllinie	Herkunft
High Five™ (H5)	<i>Trichoplusia ni</i> (Invitrogen)
Sf21	<i>Spodoptera frugiperda</i> 21 (Invitrogen)

2.1.8.3.1.2 Zelllinien und humane Zellen

Im Folgenden sind alle verwendeten murinen und humanen Zelllinien und Zellen aufgeführt. Die Kultivierung fand stets in einem Brutschrank unter konstanten Bedingungen von 37°C Temperatur, 5% CO₂-Gehalt und hoher Luftfeuchtigkeit statt.

Zelllinie	Herkunft
3T3-L1	murine Fibroblasten (American Type Culture Collection)
THP-1	humane Monozyten (American Type Culture Collection)
Zellen	Herkunft
Primäre humane Monozyten	Isolierung aus Vollblut
Primäre humane Präadipozyten	subkutanes Fettgewebe (BioCat)

2.1.8.3.2 Bakterien

Die Anzucht der *E.coli* erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C. Sie wurden zur Transformation und Vermehrung von Plasmid DNA verwendet. Die Transformation geschah mittels Hitzeschock.

<i>E.coli</i> Stämme	Marker
DH5 α -T1 ^R	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR</i> 17(<i>r_k⁻, m_k⁺</i>) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA</i>
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 ara</i> Δ 39 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>

2.1.9 RNA

Für die Amplifikation der CTRP-3 cDNA wurde kommerziell erworbene mRNA aus humanen Fettgewebe (BioCat) eingesetzt.

2.1.10 Plasmide

pDNR-Dual Donor Vektor	BD Biosciences
pLP-BacPak9 Acceptor Vektor	BD Biosciences

2.1.11 Oligonukleotide

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) synthetisiert.

2.1.11.1 Primer für die Klonierung

Die zur Amplifizierung der CTRP-3 cDNA verwendeten Primer enthielten neben der genspezifischen Sequenz jeweils eine zusätzlich angefügte Erkennungssequenz für Restriktionsendonukleasen, die die Klonierung des amplifizierten cDNA-Fragments in den pDNR-Dual Vektor ermöglichte. Die Erkennungssequenzen von *Bam*H I bzw. *Xba* I sind in den Primersequenzen hervorgehoben.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
CTRP-3_uni	GGG <u>GGATCCT</u> TTATGCTTTGGAGGCAGCTCATCTATTGG
CTRP-3_rev	GGGT <u>CTAGACC</u> CTTAGTTTCAAAGAGCAGGAATCC

Das mit diesen Primern amplifizierte PCR-Produkt hatte eine Länge von 760 bp.

2.1.11.2 Primer für die Sequenzierung

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
pDNR-Dual_uni	GTAAAACGACGGCCAG
pDNR-Dual_rev	ACCTCAGAACTCCATC

2.1.11.3 Primer für die Amplifikation muriner Gene

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Größe
β-Aktin_m_uni	CCAGGGTGTGATGGTGGGAATG	453 bp
β-Aktin_m_rev	CGCACGATTTCCTCTCAGCTG	
CTRP-3_m_uni	CATTTGCCTGAGGCGACACGGTA	227 bp
CTRP-3_m_rev	CCATAATCTCCATGGCAACACTTGC	

2.1.11.4 Primer für LightCycler-Analysen

Um die Amplifizierung genomischer DNA zu vermeiden, wurden die Primer für die LightCycler Expressionsanalysen jeweils zu beiden Seiten eines Introns gewählt. Eine Länge der amplifizierten Fragmente von etwa 300 bp garantierte kürzest mögliche Elongationszeiten. Zudem wurde im Primerdesign berücksichtigt, dass die *Annealing*-Temperatur etwa 60°C betrug (Roche Applied Science, Universal ProbeLibrary Assay Design Center: www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp).

Die Spezifität der Primer wurde durch Sequenzierung der PCR-Produkte mit Hilfe des jeweiligen uni-Primers durch die Firma GeneArt (Regensburg) verifiziert.

Oligonukleotide zur Amplifikation muriner Gene

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Größe
β-Aktin_m_uni	TGGAATCCTGTGGCATCCATG	285 bp
β-Aktin_m_rev	TAAACGCGAGCTCAGTAACAG	
IL-6_m_uni	AGTGGCTAAGGACCAAGACC	140 bp
IL-6_m_rev	TCTGACCACAGTGAGGAATG	
MIP-2_m_uni	TCCAGAGCTTGAGTGTGACG	256 bp
MIP-2_m_rev	AGGCACATCAGGTACGATCC	

2.1.12 siRNA-Sequenzen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Silencer® Pre-designed* siRNAs wurden von der Firma Ambion bezogen.

siRNA	Sequenz (5' → 3')	Identifikationsnummer
CTRP-3_sense (murin)	UGGAUUUCGUGGUUACCAAtt	s96249
CTRP-3_antisense (murin)	UUGGUAACCACGAAAUCCAta	
CTRP-3_sense (murin)	GAUGAAGCAUGAGGACGUAtt	s96250
CTRP-3_antisense (murin)	UACGUCCUCAUGCUUCAUCat	
CTRP-3_sense (murin)	UGUACAGCUAUGAAACAAAtt	s96251
CTRP-3_antisense (murin)	UUUGUUUCAUAGCUGUACAgt	

Als Kontrolle für die genspezifischen siRNAs diente die *Silencer*® Negative Control #1 siRNA der Firma Ambion.

2.1.13 Humane Proteinextrakte

Um eine mögliche differenzielle Expression von CTRP-3 in humanen Präadipozyten und reifen Adipozyten zu analysieren, wurden kommerziell erworbene Gesamtproteinextrakte der Firma BioCat verwendet. Quelle die Lysate waren primäre humane Präadipozyten bzw. reife Adipozyten (floaters) von folgenden Spendern:

Fettgewebsdepot	Geschlecht	Alter	BMI
Subkutan	Weiblich	55	23,9
Subkutan	Weiblich	55	26,4
Subkutan	Weiblich	30	30,7
Viszeral	Weiblich	40	26,1
Viszeral	Weiblich	58	40,2
Viszeral (T2DM)	Weiblich	59	56,6

2.1.14 Humane Serumproben

Im Rahmen der Arbeit wurde ein Serum-Kollektiv aus 20 Kontrollpersonen und 30 Typ 2 Diabetikern erstellt, das in Zusammenarbeit mit Dr. Margarita Bala (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg) gesammelt wurde.

Das Studienprotokoll wurde durch die örtliche Ethikkommission bewilligt und in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Deklaration von Helsinki (The World Medical Association: <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>) durchgeführt. Alle Spender wurden vor dem Eingriff durch einen Arzt über die Studie und Probenentnahme sowie damit verbundene mögliche Risiken aufgeklärt, und erklärten schriftlich ihr Einverständnis.

2.1.15 Humane Peritonealflüssigkeit

Aus einer Kohorte von 250 Patienten mit Aszites, die in der Zeit von Januar 2007 bis April 2008 aufgestellt wurde, wurde humane Peritonealflüssigkeit gewonnen. Die Proben wurden von Franz Leidl (unter der Leitung von PD Dr. Reiner Wiest und Prof. Dr. Andreas Schäffler) im Rahmen einer Studie der Inneren Medizin I (Universitätsklinikum Regensburg), gesammelt und für die Untersuchungen zur Expression von CTRP-3 in Peritonealflüssigkeit zur Verfügung gestellt [100]. Das Studienprotokoll wurde durch die örtliche Ethikkommission bewilligt und in Übereinstimmung mit den Richtlinien der

Deklaration von Helsinki (The World Medical Association: <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>) durchgeführt. Alle Spender wurden vor dem Eingriff durch einen Arzt über die Studie und Probenentnahme sowie damit verbundene mögliche Risiken aufgeklärt, und erklärten schriftlich ihr Einverständnis.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Zellen

2.2.1.1 Kultivierung von *E.coli*

E.coli-Bakterien wurden in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Die Bakterien wurden auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht inkubiert, um Einzelkolonien zu erhalten. Um eine positive Selektion der plasmidtragenden Bakterien zu ermöglichen, wurden dem Agar verschiedene Antibiotika zugesetzt. Nur Zellen mit der durch das Plasmid vermittelten Resistenz konnten somit auf den entsprechenden Agarplatten wachsen. Einzelkolonien wurden zur weiteren Vermehrung mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte in Flüssigmedium, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, überführt.

2.2.1.2 Kultivierung von Insektenzellen

Die Kultivierung von H5 und Sf21 Insektenzellen erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen für semi-adhärente Zellen mit 10 ml Medium bei 27°C in einem Brutschrank. Die H5-Zellen wurden in serumfreiem Express Five-Medium angezogen, bei Sf21-Zellen wurde das Sf900-Medium mit 10% FCS versetzt. Unter optimalen Wachstumsbedingungen setzten sich die Zellen am Boden der Zellkulturflasche ab und bildeten einen Monolayer. Nach 3-4 Tagen waren etwa 80-90% des Flaschenbodens mit den Zellen bedeckt und konnten passagiert werden. Durch leichtes Klopfen kam es zum Ablösen der Zellen vom Boden und nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 300 g wurde der Überstand abgezogen. Nach Resuspendieren der Zellen in frischem Medium war es möglich, sie schließlich im Verhältnis 1:4 bis 1:6 auf neue Zellkulturflaschen verteilen.

2.2.1.3 Kultivierung der humanen Zelllinie THP-1

Die humane Monozyten-Zelllinie THP-1 wurde in 75 cm² Zellkulturflaschen für semi-adhärente Zellen in 12 ml mit 10% FCS supplementiertem RPMI 1640 Medium im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Das Passagieren erfolgte alle 3-4 Tage, indem sie im Verhältnis 1:3 auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt und mit frischem Medium versetzt wurden. Für Stimulationen wurden die THP-1 Zellen in Zellkulturschalen ausgesät und durch die Zugabe von 100 ng/ml PMA zur

Differenzierung in einen Makrophagen-ähnlichen Zustand angeregt. Die Zellen werden dabei adhären und bilden einen Monolayer am Schalenboden aus.

2.2.1.4 Kultivierung der murinen Zelllinie 3T3-L1

Die Zelllinie 3T3-L1 ist ein Klon der aus Swiss Mausembryonen gewonnenen Fibroblastenzelllinie 3T3, die in der Lage ist, im konfluenten Zustand zu Adipozyten zu differenzieren [101]. Sie stellt somit eine der am besten charakterisierten, präadipozytären Zelllinien dar. Die Differenzierung erfolgt durch die Zugabe einer Mischung aus adipogenen Substanzen, sodass sowohl funktionell als auch morphologisch eine sehr hohe Ähnlichkeit zu primären Adipozyten erreicht wird [102].

3T3-L1 Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen für adhären Zellen in 12 ml DMEM Medium supplementiert mit 10% NCS (siehe 2.1.8.1.2, Anzuchtmedium) im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden einmal wöchentlich nach Erreichen von 80-90% Konfluenz passagiert. Durch die Verwendung von Trypsin spalteten sich Zell-Zell Kontakte während einer zehnminütigen Inkubation bei 37°C auf und ermöglichte somit das Lösen der Zellen vom Flaschenboden. Die Reaktion wurde anschließend mit frischem Anzuchtmedium, supplementiert mit Serum zur Inaktivierung von Trypsin, abgestoppt. Nach einer 6-minütigen Zentrifugation (300 g) wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:12 auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.1.4.1 Differenzierung von 3T3-L1 Zellen zu Adipozyten

3T3-L1 Fibroblasten der Passage 3 bis 8 wurden in einer Dichte von 5000 Zellen pro cm² in Zellkulturschalen in frischem Anzuchtmedium ausgesät. Die Induktion der Differenzierung erfolgte am nächsten Tag (Tag 0 der Differenzierung). Dazu wurde das Anzuchtmedium entfernt und durch Differenzierungsmedium I (siehe 2.1.8.1.2) ersetzt. An den Tagen 3 und 6 wurde dieses Differenzierungsmedium erneuert. Am Tag 7 wurde ein Mediumwechsel durchgeführt; Differenzierungsmedium II (siehe 2.1.8.1.2) wurde zu den Zellen gegeben. Am Tag 8 wurden die Zellen auf serumfreies Kultivierungsmedium (siehe 2.1.8.1.2) gesetzt. Wie die mikroskopische Kontrolle bzw. die Oil Red O Färbung der Lipidtropfen zeigte, waren die Zellen am Tag 9 optimal zu reifen Adipozyten ausdifferenziert.

2.2.1.4.2 Stimulation von 3T3-L1 Zellen

3T3-L1 Zellen wurden stimuliert durch Zugabe der jeweiligen Substanz zum frischen Medium im Anschluss an den Mediumwechsel entweder während der Differenzierung an den Tagen 0, 3, 6, 7 und 8, oder für eine ÜN-Inkubation am Tag 8. Zellen und Überstand wurden soweit nicht anders angegeben am Tag 9 geerntet.

2.2.1.5 Kultivierung von primären humanen Zellen

2.2.1.5.1 Kultivierung von primären humanen Adipozyten

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten primären humanen Adipozyten wurden von der Firma BioCat als Präadipozyten, isoliert aus verschiedenen Spendern, bezogen. Die Zellen wurden anschließend *in vitro* nach Angaben des Herstellers zu reifen Adipozyten differenziert. Dazu wurden die Präadipozyten in 75 cm² Zellkulturflaschen für adhärente Zellen für mehrere Tage bis zu einer Konfluenz von 85-90 % in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre in PM-1 Medium (*Preadipocyte Medium*) kultiviert. Mit Hilfe von Trypsin/EDTA konnten die Zellen vom Flaschenboden gelöst und passagiert bzw. in PM-1 ausgesät werden. In Zellkulturschalen wurden die Zellen anschließend für 24-48 h bis zu einer Konfluenz von 85-90 % auf PM-1 gehalten. Daraufhin wurde die Differenzierung induziert, indem das Medium durch DM-2 (*Adipocyte Differentiation Medium*) ersetzt wurde und die Zellen so für 7 Tage kultiviert wurden. Am Tag 8 wurde das Medium durch eine Mischung aus einem Teil DM-2 und zwei Teilen AM-1 (*Adipocyte Maintenance Medium*) ersetzt. Nach weiteren 7 Tagen in Kultur waren die Zellen zu Lipidtröpfchen tragenden Adipozyten herangereift und konnten für Stimulationen verwendet werden. Die Stimulation erfolgte in DMEM/Ham's F-12 supplementiert mit Penicillin und Steptomycin (siehe Kultivierungsmedium 3T3-L1, 2.1.8.1.2).

2.2.1.5.2 Isolierung und Kultivierung von primären humanen Monozyten

Zur Isolierung primärer peripherer Monozyten wurden den Probanden jeweils 10-12 8 ml-Vacutainer venöses Blut entnommen. Durch mehrmaliges Invertieren der Vacutainer wurde das entnommene Blut mit dem Natriumcitrat im Röhrchen vermischt, um eine Gerinnung des Bluts zu verhindern. Bei einer Zentrifugation bei 1700 g (25 min, RT) werden die Blutbestandteile in einem Dichtegradienten separiert. Eine Barriere aus Polyestergel hält die schwereren Bestandteile, vor allem die Erythrozyten, am Boden des Röhrchen zurück und ermöglicht es, die leichteren Komponenten, wie Plasma und mononukleäre Zellen, über

dem Gel abzunehmen. Nach der Zentrifugation wurden die Vacutainer 5-6 mal invertiert und die mononukleären Zellen mit dem Plasma entnommen. Die Zellen eines Spenders wurden in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt und nochmals zentrifugiert (300 g, 15 min, RT). Das Plasma wurde vorsichtig abgezogen, die Zellen in 20 ml PBS gewaschen (300 g, 10 min, RT), in ein Eppendorfgefäß überführt und noch einmal mit 2 ml CD14 Beads Puffer (siehe 2.1.5.5) gewaschen (200 g, 10 min, RT). Resuspendiert in 160 µl CD14 Beads Puffer wurden die Zellen mit 40 µl CD14 Beads versetzt und während einer Inkubation bei 4°C für 20 min alle 5 min durch Anschnippen des Gefäßes durchmischt. Der an die magnetischen Beads gekoppelte CD14-Antikörper kann nun an das Oberflächenprotein CD14 binden. In einem magnetischen Feld wurden die Monozyten somit von den anderen Zellen spezifisch getrennt. Dazu wurden LS Säulen mit Beads Puffer äquilibriert und die Zellen nach einem weiteren Waschschrift (200 g, 10 min, RT) in Beads Puffer auf die Säule aufgetragen. In drei Waschvorgängen mit 3 ml CD14 Beads Puffer werden sämtliche andere Zellen von der Säule entfernt. So kann außerhalb des magnetischen Feldes die Elution der Monozyten mit Beads Puffer erfolgen. Nach Zentrifugation (300 g, 5 min, RT) wurden die Zellen in RPMI-Medium, mit 10 % autologem Serum versetzt, gelöst und auf Zellkulturschalen (ca. 300000 Zellen pro cm²) ausgesät. Die Ausbeute lag bei 8-12 Millionen Monozyten pro Spender. Für Stimulationen wurden die Zellen am nächsten Tag nach Erneuerung des Mediums mit der jeweiligen Substanz versetzt und entsprechend im Brutschrank kultiviert.

Das Studienprotokoll wurde durch die örtliche Ethikkommission bewilligt und wurde in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Deklaration von Helsinki (The World Medical Association: <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>) durchgeführt. Alle Spender wurden vor dem Eingriff durch einen Arzt über die Studie und Probenentnahme sowie damit verbundene mögliche Risiken aufgeklärt, und erklärten schriftlich ihr Einverständnis.

2.2.2 Arbeiten mit DNA

2.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse [103] aus einer 3 ml Übernachtskultur von Bakterien unter Verwendung des Plasmid-Kits *QIAprep® Spin Miniprep Kit* von Qiagen. Dabei werden die Zellen durch Zugabe von Natriumhydroxid und SDS aufgeschlossen und Proteine und genomische DNA durch Neutralisation gefällt. Die Plasmid-DNA bleibt in Lösung und wird im Anschluss an eine

Silikamembran gebunden. Durch Waschen der Matrix werden verbliebene Verunreinigungen entfernt. Der dabei erreichte Reinheitsgrad der Plasmid-DNA ist für Klonierungen und Sequenzierungen angemessen.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen wird aus der Extinktion bei 260 nm nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmt. Dabei wird in einer Quarzküvette (Schichtdicke: 1 cm) gegen Wasser als Referenz gemessen. Die Lösung wurde im Verhältnis 1:100 mit Wasser verdünnt und in einem Endvolumen von 1000 µl gemessen. Unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors (V) und des für doppelsträngige DNA spezifischen Extinktionsfaktors von 50 µg ml⁻¹ (ϵ_{dsDNA}) konnte die DNA-Konzentration (c_{dsDNA}) mithilfe folgender Formel berechnet werden:

$$c_{\text{dsDNA}} = E_{260} \cdot \epsilon_{\text{dsDNA}} \cdot V$$

c_{dsDNA} : Konzentration an dsDNA in der Lösung (µg·ml⁻¹)
 E_{260} : Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm
 ϵ_{dsDNA} : Extinktionskoeffizient von dsDNA, gleich 50 µg·ml⁻¹
V: Verdünnungsfaktor, hier 100

Durch die zusätzliche Messung der Extinktion bei 280 nm konnte die Reinheit der DNA bestimmt werden. Im Idealfall liegt das Verhältnis von E_{260} zu E_{280} bei reiner, nicht degradierter DNA zwischen 1,8 und 2,1.

2.2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Durch die Auftrennung der DNA in 0,7 % bis 2 %igen Agarosegelen wurde die Größe von DNA-Molekülen analysiert. Die Agarose wurde dazu in 100 ml 1x TBE-Puffer gelöst, in einer Mikrowelle aufgeköcht und versetzt mit 1 µl Ethidiumbromid (10 µg/µl) in eine Gelkammer mit Taschenkamm gegossen. Die Proben wurden in Gelladepuffer aufgenommen, in die Taschen gefüllt und bei einer Spannung von 80 V im Gel (bedeckt mit 1x TBE-Puffer) aufgetrennt. Als Größenstandard diente eine 1 kb-DNA-Leiter. Nach Auftrennung konnten die DNA-Fragmente dann im Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht, fotografiert und gegebenenfalls für eine Aufreinigung ausgeschnitten werden.

2.2.2.4 Reinigung von DNA

2.2.2.4.1 Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen

Die Aufreinigung von DNA aus Reaktionsansätzen erfolgte mit Hilfe des *QIAquick® PCR Purification Mini Elute Kits* entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

2.2.2.4.2 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Um ein spezifisches DNA-Fragment aus einem Agarosegel aufzureinigen, wurde die entsprechende Bande mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend mit dem *QIAquick® Gel Extraction Mini Elute Kit* gemäß den Angaben des Herstellers aus dem Gelstück eluiert.

2.2.2.5 Inkubation mit Restriktionsenzymen

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurden definierte Schnitte in eine DNA eingeführt. Die DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen bei 37°C für 60 bis 90 min inkubiert und die erhaltenen Fragmente über Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.2.2.6 Inkubation mit Alkalischer Phosphatase

Um eine Religation von Plasmiden zu verhindern, die mit Restriktionsendonukleasen behandelt wurden, wurde Plasmid-DNA vor der Ligation für 10 min bei 37°C mit alkalischer Phosphatase behandelt. Dabei werden 5' Enden der DNA dephosphoryliert. Durch eine zehnminütige Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C wurde die Reaktion abgestoppt.

2.2.2.7 Ligation

Für die Ligation eines DNA-Fragments mit Vektor-DNA wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Diese Ligase ist in der Lage DNA-Stücke sowohl über komplementäre *sticky ends* als auch über *blunt ends* miteinander zu verbinden. Das optimale molare Verhältnis von Insert-DNA und Vektor-DNA liegt bei 1:3. Ein typischer Ligationsansatz sieht folgendermaßen aus:

Insert-DNA	4	µl (ca. 800 ng)
Vektor-DNA	0,5	µl (ca. 150 ng)
5x Ligasepuffer	4	µl
T4-DNA-Ligase	1	µl
ddH ₂ O	11,5	µl

Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte über Nacht bei 14°C.

2.2.2.8 Klonierung mit Hilfe der Cre-Rekombinase

Um ein DNA-Fragment auf einfache Weise von einem Donor-Vektor in einen Akzeptor-Vektor zu überführen, wurde in dieser Arbeit der *BD Creator™ DNA Cloning Kit* von BD Biosciences verwendet.

Das System macht sich das Replikationssystem des Bakteriophagen P1 zunutze. Zur Auflösung von DNA-Dimeren, die bei der Ring-zu-Ring-Replikation der Phagen-DNA entstehen, besitzt der Phage die Cre-Rekombinase, die an Erkennungsstellen, den sog. *loxP*-Stellen bindet und das Schneiden und kreuzweise Verknüpfen der DNA-Stränge vermittelt [104]. Dazu wird das gewünschte DNA-Stück wie üblich in die *multiple cloning site* (MCS) des Donor Vektors kloniert, die sich zwischen zwei *loxP*-Sequenzen befindet. Eine Inkubation mit der Cre-Rekombinase ermöglicht es, das DNA-Stück zwischen den *loxP*-Elementen in jeden Akzeptor Vektor mit einem *loxP*-Element zu transferieren. Aufgrund der zentralen Sequenz der *loxP* wird das DNA-Fragment automatisch in der richtigen Orientierung in den Akzeptor Vektor eingebaut. Ebenso wird das Leseraster vom Donor Vektor in den Akzeptor Vektor übernommen.

Ein Reaktionsansatz der Cre-*loxP* Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

Donor Vektor mit cDNA-Insert	200	ng
Akzeptorvektor	200	ng
10x Cre-Reaktionspuffer	2	μl
10x BSA (1 mg/ml)	2	μl
Cre-Rekombinase	1	μl
	ad 20	μl ddH ₂ O

Während einer Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur vermittelt die Cre-Rekombinase den spezifischen Transfer der *loxP*-flankierten Region des Donor Vektors in die *loxP*-Sequenz des Akzeptor Vektors. Danach wurde die Cre-Rekombinase bei 70°C für 5 min hitzeinaktiviert.

2.2.2.9 Transformation von *E.coli*

Für die Transformation von *E.coli*-Zellen mit Plasmid-DNA wurde das Hitzeschockverfahren verwendet. Dafür wurden chemisch kompetente *E.coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und mit der Plasmid-DNA vermischt. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis gestellt, dann bei 42°C für 30 s einem Hitzeschock ausgesetzt und anschließend 5 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden nach der Transformation in 500 μl vorgewärmtem SOC-Medium ohne Zusatz von Antibiotika bei 37°C für 1 h unter Schütteln inkubiert. Anschließend konnten die Bakterien auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert werden.

2.2.2.10 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren zur enzymatischen, exponentiellen Amplifikation spezifischer Nukleotidsequenzen [105]. Mit Hilfe der PCR können selbst geringe Mengen eines DNA-Abschnitts in einem komplexen DNA-Gemisch selektiv vervielfältigt werden.

Die PCR basiert auf einer Anlagerung (*Annealing*) und Extension zweier Primer, die auf den gegenüberliegenden Strängen in entgegengesetzter Richtung die Zielregion einer doppelsträngigen DNA flankieren. Zu Beginn der PCR steht ein 10 minütiger initialer Denaturierungsschritt (95°C), um die hier speziell verwendete, hitzeaktivierbare *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* zu aktivieren. Anschließend wird die Amplifikation durchgeführt, die sich aus 25 bis 30 Zyklen von Denaturierung, Annealing und Extension zusammensetzt. In jedem Zyklus wird die DNA zunächst in Einzelstränge überführt (Denaturierung, 30 s, 95°C), bevor bei einer niedrigeren Temperatur die beiden Primer an ihre jeweiligen komplementären Zielsequenzen hybridisieren (Annealing, 1 min, meist im Bereich von 60-65°C) und die hitzestabile DNA-Polymerase ausgehend von den gebundenen Primermolekülen an der Matrizen-DNA den komplementären Strang synthetisiert (Extension, ca. 1 min pro kb, 72°C). Ein abschließender Elongationsschritt von 10 min bei 72°C ermöglicht der DNA-Polymerase, alle synthetisierten DNA-Stränge zu vervollständigen.

Die Annealing-Temperatur ist abhängig von Länge und Sequenz der verwendeten Primer. Sie liegt etwa 5°C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer, weshalb Primer mit möglichst ähnlichen Schmelztemperaturen gewählt wurden. Eine Analyse der PCR-Produkte erfolgte auf einem Agarosegel. Für eine evtl. anschließende Klonierung wurden die Produkte aufgereinigt.

2.2.2.11 DNA-Sequenzierung

Um Klonierungen und PCR-Produkte auf ihre Richtigkeit hin zu überprüfen, wurde die DNA-Sequenz analysiert. Die Firma GeneArt (Regensburg) führte die Sequenzierungen unter Verwendung des Kettenabbruchverfahrens nach Sanger [106] durch. Für die Sequenzierungsreaktionen wurden vektor- oder sequenz-spezifische Primer eingesetzt.

2.2.2.12 Real-Time RT-PCR

Die Real-Time RT-PCR ist eine Methode, die auf der herkömmlichen DNA-Amplifikation mit Hilfe von PCR beruht, jedoch zusätzlich eine schnelle und reproduzierbare Quantifizierung von Nukleinsäuren zulässt. Bei dem Verfahren wird durch die Verwendung des DNA-Farbstoffes SYBR® Green eine Quantifizierung ermöglicht, da sich die

Fluoreszenz des DNA-interkalierenden Farbstoffes proportional zur gebildeten DNA-Menge verhält. Die Vervielfältigung des PCR-Produkts kann so während des gesamten Reaktionsverlaufs verfolgt und die absoluten bzw. relativen Mengen an DNA im eingesetzten Probenmaterial anhand einer Standardkurve berechnet werden.

Für alle Versuche wurde der *LightCycler® FastStart DNA Master SYBR® Green I* Kit (Roche) verwendet. Ein typischer Reaktionsansatz hat folgendes Schema:

Reaktionsmix (Roche)	2	µl
MgCl ₂ , 25 mM	2,4	µl
universe Primer, 5 pmol/µl	1	µl
reverse Primer, 5 pmol/µl	1	µl
cDNA	2	µl
ddH ₂ O	11,6	µl

SYBR® Green I, Reaktionspuffer, dNTPs und HotStart Taq-Polymerase waren im Reaktionsmix bereits enthalten. Die Reaktion wurde in dünnen Glaskapillaren durchgeführt, die über ein Probenkarussell in die Reaktionskammer eingebracht wurden.

Zur Aktivierung der HotStart Taq-Polymerase beginnt das Protokoll mit einem initialen Hitzeschritt für 10 min bei 95°C. Anschließend wurden 40-45 Amplifizierungszyklen durchgeführt. Dabei setzte sich jeder Zyklus aus 15 s Denaturierungsphase bei 95°C, 10 s *Annealing*phase bei etwa 60°C und 10 s Elongationsphase bei 72°C zusammen. Die genaue *Annealing*temperatur wurde anhand der Schmelztemperatur des für die jeweilige Reaktion eingesetzten Primerpaares bestimmt.

Nach der Amplifikation wurde bei jedem Lauf noch die Spezifität des PCR-Produktes anhand einer Schmelzkurve analysiert. Dabei wird die DNA langsam (0,1°C/s) von 60°C auf 95°C erhitzt und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Bei einer spezifischen Reaktion wird nur ein Produkt gebildet. Dieses schmilzt bei einer charakteristischen Temperatur, wodurch die Fluoreszenz abrupt abnimmt.

Zur Berechnung der Ausgangskonzentration an cDNA wurde in jedem Amplifikationszyklus nach Abschluss der Elongationsphase, bei einer für das PCR-Produkt geeigneten Temperatur (75-85°C), die Fluoreszenz der Probe gemessen.

Die Fluoreszenzmesswerte werden nun in einem Graphen gegen die Zyklenzahl aufgetragen, was eine Bestimmung des sog. *Crossing Point* (Cp) während der exponentiellen Phase der PCR ermöglicht. Dieser Punkt bezeichnet den Reaktionszyklus, in dem das Fluoreszenzsignal des PCR-Produkts messbar zunimmt im Vergleich zur Hintergrundfluoreszenz. Durch die Verwendung einer Standardkurve kann die Effizienz unterschiedlicher PCR-Reaktionen berücksichtigt werden. Diese wird aus einer zur Probe

ähnlichen cDNA hergestellt und schrittweise 1:1 verdünnt. Es werden vier Standardproben verwendet, denen ein definierter Konzentrationswert zugewiesen wird. Anhand dieser Standardkurve können die gemessenen Cp-Werte der Proben in arbiträre Werte umgerechnet werden. Diese Umrechnung der Cp-Werte mit Hilfe der Standardkurve in definierte Zahlenwerte erlaubt es, PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen Effizienzen zu vergleichen.

Um nun eine Aussage über eine veränderte Genexpression treffen zu können, wurde neben der mRNA der Zielgene auch die mRNA eines *Housekeeping* Gens bestimmt. Ein *Housekeeping* Gen ist ein Gen, das in den verschiedenen Geweben bzw. durch die verwendete Stimulation der Zellen nicht reguliert wird. Der Quotient aus Konzentration $cDNA_{\text{Zielgen}}$ zu Konzentration $cDNA_{\text{Housekeeping Gen}}$ gibt somit einen zum Referenzgen normalisierten Wert wieder. Der Quotient der normalisierten Werte zweier Proben wiederum drückt die relative Expression des Zielgens in Abhängigkeit von der verwendeten Stimulation bzw. in den verschiedenen Geweben aus.

2.2.3 Arbeiten mit RNA

2.2.3.1 Isolierung von RNA aus Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen wurde mithilfe des *RNeasy® Mini Kits* von Qiagen oder des TRIzol Reagenz von Invitrogen isoliert.

Der Zellüberstand wurde abgenommen und die Zellen nach einem Waschschrift mit PBS in 500 µl des jeweiligen Lysereagenz (RLT oder TRIzol) lysiert. Dazu wurde zunächst die genomische DNA durch mehrmaliges Auf- und Abziehen des Lysats durch eine dünne Kanüle geschert. Anschließend konnte die RNA nach Protokoll des Herstellers über die Säulchentechnik isoliert werden. Die Elution der RNA von der Säule wurde zweimal mit je 30 µl nukleasefreiem Wasser (Promega) durchgeführt und bei -80°C aufbewahrt.

Wurde gesamt-RNA aus Fettgewebe isoliert, erfolgte dies unter Verwendung von TRIzol Reagenz. Ca. 50 mg des in RNAlater Reagenz aufbewahrten Gewebes wurden dreimal 30 s mit dem Ultra-Turrax in 1 ml TRIzol homogenisiert. Um Gewebereste und Fett zu entfernen, wurde das Homogenat abzentrifugiert (300 g, 10 min). Des Weiteren wurde durch mehrmaliges Auf- und Abziehen des Homogenats in einer dünnen Kanüle die genomische DNA geschert. Die RNA wurde des Weiteren nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA wurde in 30 µl nukleasefreiem Wasser (Promega) aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration von Gesamt-RNA wurde wie die DNA-Konzentration durch Messung der Extinktion bei 260 nm in einer 1:100–Verdünnung in nukleasefreiem Wasser bestimmt. Die Berechnung erfolgte ebenfalls mit dem Lambert-Beerschen Gesetz. Dafür wurde der für RNA spezifische Extinktionskoeffizient von $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ in die Formel eingesetzt.

$$C_{\text{RNA}} = E_{260} \cdot \epsilon_{\text{RNA}} \cdot V$$

C_{RNA} : Konzentration an RNA in der Lösung ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)
 E_{260} : Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm
 ϵ_{RNA} : Extinktionskoeffizient von RNA, gleich $40 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$
 V : Verdünnungsfaktor, hier 100

2.2.3.3 Reverse Transkription

Um das Ausgangsmaterial für eine PCR zu erhalten, wurde isolierte Gesamt-RNA mit der Reversen Transkriptase des Avian-Myoblastosis-Virus (AMV-RT) in einzelsträngige cDNA überführt. Hierbei wurde das *Reverse Transcription System* von Promega verwendet. Als Primer wurden *Random Hexamer* Primer eingesetzt. Das Enzym ist in der Lage, mit Hilfe der Primer und der RNA als Matrize den komplementären cDNA-Strang zu synthetisieren. Ein Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

MgCl ₂ , 25 mM	8	μl
RT-Puffer, 10 x	4	μl
dNTP-Mix, 10 mM	4	μl
Random Hexamer Primer, 0,5 μg/μl	1	μl
RNasin Ribonuklease-Inhibitor, 40 U/μl	0,5	μl
AMV-Reverse Transkriptase, 25 U/μl	0,6	μl
RNA (1 μg) in nukleasefreiem Wasser	21,9	μl

Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 42°C inkubiert. Im Anschluss folgte die Hitzeinaktivierung der AMV-RT durch fünfminütige Inkubation bei 95°C. Die cDNA konnte anschließend bei -20°C gelagert werden.

2.2.3.4 Transfektion mit siRNA

Durch die Verwendung von siRNA kann ein spezifischer Knockdown eines Gens in Zellen verursacht werden [107]. Die siRNA besteht dabei aus doppelsträngiger RNA (dsRNA), die durch Transfektion in die Zellen eingebracht wird. Die Sequenz der siRNA wird so gewählt, dass sie zu einem kleinen Abschnitt der mRNA des Zielgens homolog ist. In der Zelle läuft daraufhin ein Prozess ab, der durch das Protein *Dicer* vermittelt wird: die doppelsträngige RNA wird in 19–22 bp lange Oligonukleotide gespalten, der sense-Strang

wird degradiert, während der antisense-Strang in den *RNA induced silencing complex (RISC)* eingebaut wird. Mit Hilfe dieser RNA-Fragmente kann der Komplex an komplementäre mRNA Abschnitte des Zielgens binden. Dieser Prozess führt schließlich zur gerichteten Spaltung und Degradation komplementärer mRNA. So wird es möglich, die Expression eines ausgewählten Gens zu unterdrücken (*Knockdown*), ohne die Expression anderer Gene zu verändern.

Die Transfektion von 3T3-L1 Zellen oder humanen Präadipozyten mit siRNA wurde mit dem *X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent* von Roche durchgeführt. Ein Transfektionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

siRNA (100 nM)	10	µl
X-treme	5	µl
DMEM/Ham's F-12 Medium, serumfrei	85	µl

Das Medium wurde in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß vorgelegt. Die siRNA und das Transfektionsreagenz wurden nacheinander zugegeben, der Ansatz für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise auf die Zellen (900 µl frischem Zellkulturmedium) gegeben. Die Präadipozyten wurden stets am Tag 0 der Differenzierung transfiziert. Die weitere Differenzierung und Stimulation erfolgte wie zuvor beschrieben.

2.2.4 Arbeiten mit Proteinen

2.2.4.1 Präparation von Proteinextrakten

Um Gesamtproteinextrakten aus Zellen zu erhalten, wurde der Zellüberstand abgesaugt und die Zellen in eiskaltem PBS mit Proteaseinhibitor mit einem Schaber vom Boden der Zellkulturflasche bzw. -schale gelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 50 µl eiskalten RIPA-Zelllysepuffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren resuspendiert und auf Eis schließlich die genomische DNA mit Hilfe von Ultraschall geschert. Eine Aufbewahrung der Proben war bei -20°C möglich.

2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte anhand der Bicinchoninsäure (BCA) Methode [108]. Dabei wurden 200 µl einer 1:50-Mischung von 4%iger Kupfer(II)sulfatlösung und Bicinchoninsäure mit 10 µl einer 1:10-Verdünnung der Probe in PBS versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Proteine reduzieren die Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{+} -Ionen, die wiederum mit der Bicinchoninsäure reagieren und dabei einen violetten

Farbkomplexes bilden. Dieser lässt sich bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch nachgewiesen. Dabei ist die Produktbildung proportional zur Proteinmenge, was eine Berechnung der Proteinkonzentration der Proben über eine BSA-Standardkurve zulässt.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dazu werden die Proben zunächst in einem Probenpuffer aufgekocht, der SDS und β -Mercaptoethanol enthält [97]. Durch die Hitze werden die Proteine denaturiert, β -Mercaptoethanol führt außerdem zur Spaltung von Disulfidbrücken, während die im Überschuss vorhandenen negativgeladenen SDS-Moleküle dafür sorgen, dass die Eigenladung der Proteine überdeckt wird und die Polypeptidketten eine konstant negative Ladung pro Masseneinheit erhalten. Somit wandern die Proteine im elektrischen Feld ausschließlich in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht und der Porengröße des Polyacrylamidgels.

In der Arbeit wurden 4,5 %ige Sammelgele und 10 bzw. 12,5 %ige Trenngele verwendet. Durch die Zugabe der entsprechenden Mengen an APS und TEMED wurde die radikalische Polymerisation des Acrylamids ausgelöst. Die Gele wurden in die Apparatur eingespannt und mit 1x SDS-Gellaufpuffer bedeckt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:4 mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C aufgekocht. Das größer porige Sammelgel, versehen mit einem Kamm, der die Ausbildung der Geltaschen ermöglicht, dient dazu, die Proteine vor dem Eintritt in das Trenngel aufzukonzentrieren. Im darunterliegenden engmaschigen Trenngel werden die Proteine nun nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Sofern nicht anders angegeben wurden pro Spur 20 μ g Protein geladen. Zudem wurde der *Full-Bereich Rainbow Molecular Weight Marker* als Proteinstandard aufgetragen, mit dem die Größe der aufgetrennten Proteine abgeschätzt werden konnte. Die Elektrophorese wurde ca. 60 min bei einer Stromstärke von 25 mA pro Gel durchgeführt.

2.2.4.4 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine sehr sensitive Methode, um Proteine in Acrylamidgelen nachzuweisen. Dabei bilden Proteine und Silberionen einen Komplex, der durch die Reduktion mit Formaldehyd sichtbar wird. Bei dieser Reaktion werden Silberionen zu elementarem Silber reduziert, das als unlösliches braunes Präzipitat ausfällt. Die Färbung wurde nach dem Protokoll von Heukeshoven und Dernick durchgeführt [98].

Dazu wurde das Gel nach der Gelelektrophorese zunächst 30 min in der Fixierlösung und anschließend 30 min in der Inkubationslösung inkubiert. Danach folgten drei Waschschritte

von jeweils 5 min in Wasser. Für 40 min wurde das Gel in der Silberlösung geschwenkt und erneut kurz mit Wasser gewaschen, bevor die Reduktion der Silberionen in der Entwicklerlösung erfolgte. Die Inkubation in der Entwicklerlösung erfolgt solange, bis die Proteine deutlich als braune Banden zu erkennen sind. Durch die EDTA-haltige Stopplösung wurde die Reaktion schließlich abgebrochen. Das Gel wurde kurz in Wasser gewaschen und mit dem *DryEase® Mini-Gel Drying System* getrocknet.

2.2.4.5 Western-Blot

Die Methode des Western-Blot bezeichnet den elektrophoretischen Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Trägermembran mit anschließendem immunologischen Nachweis [99].

Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren wird als *Wet-Transfer*-Verfahren bezeichnet. Dabei wird der Elektrotransfer in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer durchgeführt. Alle verwendeten Netzchen und Whatman-Filterpapiere, sowie das SDS-Acrylamidgel und die Membran wurden kurz in Wettransferpuffer äquilibriert. Die eingesetzte *Immun-Blot™* PVDF Membran (Bio-Rad) wurde vor der Äquilibration kurz mit Methanol benetzt. Aus den Filterpapieren, der Membran und dem Gel wurde ein „Blot-Sandwich“ in einer Kassette aufgebaut und in die Apparatur eingespannt. Der eingesetzte Eisblock sorgte dabei für die Kühlung des Puffers, der mithilfe eines Magnetrührers ständig gemischt wurde. Die Proteine wurden dabei für 60 min bei einer konstanten Spannung von 90 V auf die Membran übertragen.

Durch eine anschließende Antikörper-gekoppelte Chemilumineszenzreaktion wurden die Proteine später nachgewiesen. Dafür wurde die Membran zunächst eine Stunde lang in Blockierlösung geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Drei 10-minütige Waschschrte mit PBST bzw. TBST wurden anschließend durchgeführt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in Antikörperlösung. Die Membran wurde am darauffolgenden Tag für eine weitere Stunde bei RT mit dem primären Antikörper inkubiert. Der primäre Antikörper wurde schließlich abgenommen und unspezifisch gebundener Antikörper durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit sekundärem Antikörper für eine Stunde bei RT. Dieser Antikörper wurde meist im Verhältnis 1:5000 in der Blockierlösung verdünnt und ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. Nach weiteren Waschschrten erfolgte die Detektion der HRP mittels *ECL Plus Western-Blotting Detection Reagent* (Amersham Biosciences). Die zwei Reagenzien des ECL-Systems wurden nach Angabe des Herstellers miteinander vermischt, die Membran mit 1 ml dieser Mischung bedeckt und 5 min bei RT

inkubiert. Die HRP verursacht in der ECL-Lösung eine Reaktion, die zur Freisetzung von Chemilumineszenz führt. Mit Hilfe eines Autoradiographiefilms können die Lichtsignale detektiert werden. Dafür wurde die Membran in einer Klarsichtfolie in eine lichtdichte Filmkassette gelegt und ein *Hyperfilm ECL*TM je nach Intensität des Signals für wenige Sekunden bis zu maximal 60 min aufgelegt, sodass nach Entwicklung des Films das über den Antikörper nachgewiesene Protein als dunkle Bande zu sehen war.

2.2.4.6 Coomassie-Färbung

Mit Hilfe des Coomassie-Farbstoffes können Proteine unter Bildung eines blauen Komplexes unspezifisch nachgewiesen werden. So wurden die anhand SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf einer PVDF Membran sichtbar gemacht. Dafür wurde die Membran nach der Elektrophorese 15 min in Wasser gewaschen und dann in *Biosafe*TM Coomassie (Bio-Rad) inkubiert, bis die Proteinbanden sichtbar waren. Im Anschluss wurde die Membran in Wasser gewaschen und getrocknet.

2.2.4.7 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Gelöste Proteine können mit Hilfe des *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) spezifisch nachgewiesen werden. Das Prinzip läuft analog zum Western-Blot ab, beruht also auf einer Antikörper-gekoppelten Farbreaktion. Der am Plattenboden gebundene Antikörper (Capture AK) immobilisiert zunächst das Protein, sodass es in einem weiteren Schritt mit dem Detection Antikörper nachgewiesen werden kann. Dieser Antikörper ist an ein Enzym gekoppelt, das ein farbloses Chromogen in ein farbiges umsetzt. Der Farbstoff wird proportional zur Menge des gebundenen Proteins gebildet und kann photometrisch nachgewiesen werden. Über eine Standardkurve lässt sich somit die Proteinkonzentration der Probe berechnen. Man bezeichnet diese Art des ELISA als Sandwich-ELISA.

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten humanen und murinen ELISA wurden entsprechend den Angaben der Hersteller zur Quantifizierung gelöster Proteine in Zellkulturüberständen bzw. in Serumproben verwendet.

2.2.4.8 Bestimmung des Zelltodes

Als System zur Untersuchung einer möglichen zytotoxischen Wirkung verschiedener Substanzen auf die Zellen wurde der *Cytotoxicity Detection Kit* von Roche verwendet. Dabei wird die Lactat-Dehydrogenase (LDH) in Zellkulturüberständen colorimetrisch nachgewiesen. Dieses Enzym wird in Folge des Zelltodes aus dem Zytoplasma in den

Extrazellulärraum freigesetzt. Die gemessene LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand korreliert somit direkt mit der Anzahl der abgestorbenen Zellen.

Dazu wurde der Zellkulturüberstand 1:2 mit dem jeweils verwendeten Kulturmedium verdünnt und auf einer 96-well-Platte mit den Reaktionskomponenten NAD^+ , Katalyst und dem Farbstoff Tetrazolium laut Protokoll des Herstellers versetzt. Das Kulturmedium diente dabei als Negativkontrolle. Nach der 30 minütigen Inkubation (RT, unter Lichtabschluss) setzt die LDH das im Überstand enthaltene Lactat zu Pyruvat um, wobei gleichzeitig NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert wird. Der Katalyst setzt in einer zweiten Reaktion den schwach gelben Farbstoff Tetrazolium unter Verbrauch des in der ersten Reaktion gebildeten NADH/H^+ in den roten Farbstoff Formazan um, der photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen werden kann.

2.2.4.9 Oil Red O Färbung

In 3T3-L1 Adipozyten wurden Größe und Anzahl der Lipidtröpfchen anhand Oil Red O Färbung analysiert. Dafür wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach der Fixierung mit 10 %igem Formaldehyd (5 min bei RT) wurde mit 60 %igem Isopropanol gewaschen, kurz an der Luft getrocknet und für 20 min mit Oil Red O Färbelösung inkubiert. Die Färbelösung wurde entfernt und die Zellen mehrmals mit Wasser gewaschen. Unter dem Mikroskop waren die Lipidtröpfchen mit ihrer nun leuchtend roten Färbung gut sichtbar.

2.2.4.10 Untersuchungen mit TLR4/MD-2 Fusionsproteinen

Für diese Arbeit wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Werner Falk und Dr. Philipp Gross (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg) Untersuchungen mit einem TLR4/MD-2 Fusionsprotein und dessen Bindung an LPS durchgeführt. Ziel war es, zu untersuchen, ob CTRP-3 fähig ist, einen Einfluss auf die Bindung von LPS an das TLR4/MD-2 Fusionsprotein auszuüben. Dazu wurden lösliche Fusionsproteine verwendet, die in stabil-transfizierten HEK 293T bzw. Schneider S2 hergestellt wurden und in den jeweiligen Zellkulturüberständen zu finden waren. Mit Hilfe dieser Überstände und den zuvor bereits etablierten Methoden [109] zur LPS-Bindung konnten auf Ebene der Immunpräzipitation, aber auch ELISA-basierend Bindungsstudien durchgeführt werden.

2.2.4.10.1 Immunpräzipitation/LPS-Bindungsassay

Um die Bindung von LPS an die TLR4/MD-2 Fusionsproteine zu überprüfen bzw. die kompetitive Hemmung der LPS-Bindung durch CTRP-3 zu testen, wurden Immunpräzipitationen mittels Streptavidin-konjugierter Sepharose durchgeführt. Diese ist dazu in der Lage, biotinylierte Substanzen zu präzipitieren. In dieser Arbeit wurden HEK 293T Zellkulturüberstände, die lösliche TLR4/MD-2 Fusionsproteine, einen FLAG-Tag tragend, enthielten, mit Biotin-gelabeltem LPS inkubiert und mithilfe der Sepharose gefällt. Die Präzipitate wurden nach drei Waschschritten mit PBS mit 2x Lämmli Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 5 min aufgekocht. Die Sepharose wurde pelletiert und mit den Überständen konnte ein Nachweis der Bindung anhand Anti-FLAG Antikörper mittels Western-Blot analysiert werden.

Um Substanzen auf ihre Fähigkeit der kompetitiven Hemmung der LPS-TLR4/MD-2 Bindung zu überprüfen, wurde die Inkubation in Anwesenheit eines Überschusses an nicht-markiertem LPS (positiv Kontrolle) bzw. CTRP-3 in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt.

2.2.4.10.2 LPS-Bindungs-ELISA

ELISA-basierende Bindungsstudien wurden anhand eines etablierten LPS-Bindungs-ELISA durchgeführt. Dafür wurden MaxiSorp™ 96-well ELISA Platten über Nacht mit Anti-FLAG M2 monoklonalem Antikörper beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (siehe 2.1.5.3.5), wurde eine 1-stündige Blockierung mit PBS + 5% BSA durchgeführt und im Anschluss für 2 Stunden mit Fusionsprotein-enthaltenden Überständen inkubiert. Nach weiterem Waschen erfolgte eine Inkubation mit 100 µl Biotin-LPS (0,5 µg/ml) in PBS + 20 % FCS für eine weitere Stunde. Das gebundene biotinylierte LPS konnte schließlich mittels Streptavidin-HRP (0,25 µg/ml, 30 min) detektiert und mit Substratlösung (R&D Systems, 100 µl) nach abstoppen der Reaktion mit Hilfe von 1 M H₂SO₄ photometrisch nachgewiesen werden (450 nm). Um einen Einfluss von CTRP-3 auf die LPS Bindung zu analysieren, wurden dem biotinylierten LPS verschiedene Mengen an CTRP-3 beigemischt. Als Positivkontrolle wurde unmarkiertes LPS in 100fachem Überschuss (50 µg/ml) verwendet.

2.2.4.11 Glyzerolassay

Zur Untersuchung der Lipolyserate von Zellen wurde der *Free Glycerol Assay* Kit der Firma BioCat verwendet. Damit lässt sich in Zellüberständen vorhandenes freies Glyzerol nachweisen, indem es enzymatisch oxidiert wird. Das entstehende Produkt reagiert im

Anschluss mit dem Reagenz des Kits und bildet einen Farbkomplex aus, der bei 570 nm photometrisch detektiert werden kann. Mit Hilfe der Standardkurve lässt sich die Menge an Glyzerol bestimmen.

2.2.4.12 Nachweis von intrazellulären Triglyzeriden

Der *Triglyceride GPO-PAP* Halbmikro-Test der Firma Roche nutzt eine Lipoproteinlipase von Mikroorganismen, um die Triglyzeride zu Glycerin zu hydrolysieren und anschließend vollständig zu Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid zu oxidieren. Das H_2O_2 kann schließlich unter der katalytischen Wirkung der Peroxidase mit 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol einen roten Farbstoff bilden. Seine Intensität kann bei 540 nm gemessen werden. Als Standard wurde der Glycerin-Standard der Firma Sigma verwendet. Für die Bestimmung von intrazellulären Triglyzeriden wurden 1-5 µl Zelllysats in die reaktion eingesetzt und anhand des verwendeten Standards in Triglyzerid-Konzentrationen umgerechnet. Die Werte wurden anschließend bezogen auf die Proteinkonzentrationen des verwendeten Lysats.

2.2.5 Rekombinante Expression von CTRP-3 in H5 Insektenzellen

2.2.5.1 Expression rekombinanter Proteine im Bakulovirus Expressionssystem

Das Bakulovirus Expressionssystem stellt ein äußerst effizientes eukaryotisches Expressionssystem zur Herstellung rekombinanter Proteine dar. Es basiert auf der Infektion von Insektenzellen, hier Sf21- und H5-Zellen, mit rekombinanten Bakuloviren.

Die *Baculoviridae* sind eine Gruppe von Viren, die vor allem Insekten infizieren. Das Bakulovirus ist ein großes DNA-Virus, das sich als Expressionssystem für eukaryotische Proteine etabliert hat. Es wird vor allem das *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) verwendet.

Das AcNPV-Genom trägt Gene, die für die Replikation des Virus in der Zellkultur nicht notwendig sind. Eines dieser Gene ist das Polyhedrin-Gen, das für das Polyhedrin-Protein kodiert und wichtig ist für die Propagation des Virus in seinem natürlichen Habitat. Dieses Gen kann deletiert und durch die cDNA des Zielgens ersetzt werden. Dabei wird das Zielgen unter die Kontrolle des starken Polyhedrin-Promotors gestellt, der für eine hohe Transkriptionsrate und eine Expression des rekombinanten Proteins von über 30 % des Gesamtproteins sorgt.

In diesem System ist es außerdem von großem Vorteil, dass Proteine mit Signalpeptiden in den Zellüberstand sezerniert und daraus auf einfache Weise gereinigt werden können. Des

Weiteren ermöglicht eine Expression in Insektenzellen im Gegensatz zu prokaryotischen Expressionssystemen posttranslationale Modifikationen, die für die Funktionalität des rekombinanten Proteins wichtig sein können.

2.2.5.2 Klonierung der CTRP-3 cDNA in den pLP-BacPak9 Expressionsvektor

Aus 2 µg humaner Fettgewebs-mRNA wurde cDNA mittels Reverser Transkription (s. 2.2.3.3) unter Verwendung von Oligo-dT Primern synthetisiert und diese zur Amplifizierung der CTRP-3 cDNA mittels PCR mit den genspezifischen Primern CTRP-3_uni und CTRP-3_rev (s. 2.1.11.1) verwendet. Somit wurde ein 760 bp langes DNA-Fragment gewonnen, das durch die Verwendung spezifischer Primer mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *BamH* I und *Xba* I versehen wurde und somit für eine *in frame* Klonierung in die *Multiple Cloning Site* des pDNR-Dual Donor Vektor zur Verfügung stand. Der pDNR-Dual Donor Vektor trägt ein Ampicillin-Resistenzgen zur positiven Selektion, wodurch die plasmidtragenden Klone auf LB_{amp}-Agarplatten schnell identifiziert werden konnten. Eine Restriktionsanalyse und anschließende Sequenzierung wurde zur Verifizierung durchgeführt. Die Übertragung in den pLP-BacPak9 Expressionsvektor erfolgte anhand des Cre-*loxP* Transfersystems. Dazu wurde die CTRP-3 cDNA und die daran anschließenden Sequenzen für den C-terminalen 6 x HN-Tag und einer Chloramphenicolresistenz über beiderseits flankierende *loxP*-Elemente (s. 2.2.2.8) übertragen. Nach Transformation in *E.coli* Zellen wurde auf selektiven LB-Chloramphenicol-Sucrose-Agarplatten ausplattiert. Die zweifache Selektion mit Chloramphenicol und Sucrose sorgte dafür, dass mehr als 90 % der Kolonien den Expressionsvektor trugen. Mit Hilfe der Sucrose konnten Donor-Vektor tragende Klone negativ selektioniert werden, da der pDNR-Dual Vektor das Levanase kodierende *SacB*-Gen trägt. Dieses Enzym führt zur Umsetzung der Sucrose zu dem toxischen Metabolit Levan. Dagegen führte Chloramphenicol zur positiven Selektion von Expressionsvektor-tragenden Klonen. Diese wurden im Anschluss auf das Tragen des korrekten Insert mittels Restriktionsenzymanalysen verifiziert.

2.2.5.3 Generierung rekombinanter Bakuloviren

Das BacPakTM Baculovirus Expression System von BD Biosciences wurde zur Generierung der rekombinanten Bakuloviren verwendet. Dazu wurden Sf21-Zellen mit BacPAK6 viraler DNA und dem pLP-BacPak9-Expressionsvektor, der die cDNA von CTRP-3 enthielt, kotransfiziert. Durch die Verwendung von BacPAK6 wird eine Selektion auf rekombinante

Viren durchgeführt. Die virale DNA liegt deletiert vor, ihr fehlt das Polyhedrin-Gen und der benachbarte ORF 1629. Dieser ist essentiell für die Replikation des Virus.

Der Expressionsvektor besitzt den fehlenden ORF 1629 sowie den Polyhedrin-Promotor. Nach homologer Rekombination zwischen Virus-DNA und den entsprechenden viralen Sequenzen im Plasmid vermehren sich somit nur rekombinante Viruspartikel mit dem Zielgen anstelle des Polyhedrin-Gens.

Der Kotransfektionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

BacPAK6 virale DNA, 20 ng/μl	5	μl
pLP-BacPak9 mit CTRP-3 cDNA-Insert, 160 ng/μl	3,2	μl
Bacfectin	4	μl
ddH ₂ O, steril	89,7	μl

Nach 15 minütiger Inkubation des Ansatzes bei RT wurde dieser tröpfchenweise auf die 1×10^6 Sf21-Zellen gegeben. Dabei wurde die Kulturschale leicht geschwenkt. Um das Stören von Serumkomponenten zu verhindern, wurde die Kotransfektion in 1,5 ml serumfreiem SF900-Medium durchgeführt. So wurden die Zellen für 5 h bei 27°C inkubiert und weiterhin nach Zugabe von 1,5 ml BacPAK Complete Medium für 72 h 27°C kultiviert. Die Zellen wiesen nach Ablauf dieser Zeit phänotypische Veränderungen auf, die für eine Infektion typisch sind: infizierte Zellen nehmen an Größe zu und besitzen dunkle Einschlüsse. Außerdem lösen sie sich leichter vom Boden der Kulturflasche ab. Der Überstand mit den rekombinanten Viren wurde abgenommen und zentrifugiert (300 g, 5 min) und konnte bei 4°C unter Lichtabschluss gelagert werden. Er diente zur Infektion von H5-Zellen zur weiteren Vermehrung der Viren.

Die Sf21-Zellen der Kotransfektion konnten geerntet und zur Überprüfung der CTRP-3 Expression, gelöst in RIPA-Puffer, Western-Blot Analysen unterzogen werden.

2.2.5.4 Infektion von Insektenzellen

Insektenzellen wurden mit den rekombinanten Bakuloviren infiziert, um einerseits die Viren zu vermehren, andererseits, um das rekombinante Protein zu exprimieren. Dafür bilden H5 Zellen einen optimalen Wirt, da sie sich in serumfreiem Express FiveTM Medium kultivieren lassen und somit die Reinigung des sezernierten Proteins aus dem Medium erleichtert wird. $2,5 \times 10^7$ H5 Zellen wurden in 10 ml Express FiveTM Medium in einer Zellkulturflasche für semi-adhärenente Zellen ausgesät und mit 100-1000 μl eines Virenüberstands infiziert. Dabei wurde die geeignete Menge an infektiösem Überstand empirisch ermittelt. Die infizierten Zellen wurden für 4 Tage bei 27°C kultiviert. Am Tag

der Ernte wurde der Zellüberstand abgenommen und für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Ein kleiner Teil davon wurde unter Lichtabschluss für weitere Infektionen bei 4°C aufbewahrt. Die restlichen Überstände wurden zur Inaktivierung von Proteasen mit EDTA-freiem *Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail* (Roche) versetzt und bis zur Aufreinigung bei –80°C aufbewahrt. Die übrigen Zellen konnten mit RIPA-Lysepuffer gelöst und in Western-Blot Analysen auf die Expression von CTRP-3 überprüft werden.

2.2.5.5 Reinigung des rekombinanten CTRP-3

Aufgrund seines natürlichen Signalpeptids sezernieren H5-Zellen das exprimierte CTRP-3 in das Kulturmedium. Daraus kann es aufgrund seines C-terminalen 6 x HN-Tag mit Hilfe des *BD TALONTM Purification Kit* (BD Biosciences) auf einfache Weise aufgereinigt werden.

Die Zellkulturüberstände wurden zunächst über Nacht bei 4°C unter einmaligen Pufferwechsel gegen PBS dialysiert. So konnte die Salzkonzentration des Mediums reduziert werden. Die Überstände wurden zur Entfernung möglicher Präzipitate einmal filtriert. 500 µl Resin wurde mit 500 µl Äquilibrationpuffer gewaschen, abzentrifugiert und zu je 50 ml Überstand gegeben (*BD TALONTM Buffer Kit*). Anschließend folgte eine 3-stündige Inkubation bei 4°C unter Schütteln.

Die anschließende Aufreinigung über eine Affinitätssäule folgt dem Prinzip der *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC). Hierbei binden die Histidin-Seitenketten des 6 x HN-Tags reversibel an die immobilisierten Co²⁺-Ionen des *TALONTM Metal Affinity Resins*. Imidazol konkurriert mit den Histidin-Seitenketten kompetitiv um die Bindungsstellen an den Co²⁺-Ionen. Dadurch kann man das Protein nach einigen Waschschritten unter nativen Bedingungen mit einem Imidazol-haltigen Puffer von der Säulenmatrix eluieren.

Dafür wurde das Resin aus den Überständen abzentrifugiert (700 g, 5 min) und das Pellet in 900 µl Äquilibrationpuffer mit 0,5% Tween®20 gelöst. Ein Minisäulchen (*HandeeTM Mini-Spin Column*) wurde damit beladen und das Resin konnte sich in der Säule absetzen. Anschließend wurde mit 6 ml Äquilibrationpuffer gewaschen, der mit 0,5% Tween®20 und 1 mM Imidazol versetzt war. Diese beiden Zusätze im Waschpuffer sorgten dafür, dass sich unspezifisch gebundene Proteine von der Resin-Matrix lösen. Es wurde noch einmal mit 1 ml Äquilibrationpuffer supplementiert mit 0,5% Tween®20 gewaschen, bevor das CTRP-3 Protein in vier Fraktionen mit je 210 µl Elutionspuffer (*BD TALONTM Buffer Kit*), der 150 mM Imidazol enthielt, von der Matrix eluiert wurde.

Je 10 µl der Fraktionen wurden anhand SDS-PAGE aufgetrennt und das Protein durch Silberfärbung nachgewiesen. Alle Fraktionen, die das Protein in reiner Form enthielten, wurden vereinigt und bei 4°C zweimal 1 h gegen PBS dialysiert, um das Imidazol zu entfernen. Die Fraktionen wurden sterilfiltriert, die Proteinkonzentration bestimmt und portioniert und im Anschluss bei -80°C aufbewahrt. Noch verunreinigte Fraktionen wurden vereinigt und gegen PBS dialysiert, um dann nochmals einer Reinigung unterzogen zu werden.

2.2.6 Tierexperimente

In dieser Arbeit wurden C57BL/6 Mäuse der Firma Charles River (Sulzfeld) verwendet. Die Wildtyp-Mäuse wurden einem Entzündungsmodell (SIRS) unterzogen, indem ihnen 1 µg LPS pro Maus (in PBS) intraperitoneal gespritzt wurde. Nach 2 h wurden die Mäuse getötet und das Herzblut und epididymales Fettgewebe entnommen. Aus dem Blut wurde Serum gewonnen und darin pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6 und CXCL2/MIP-2 bestimmt. Aus epididymalem Fettgewebe wurde mRNA isoliert und damit LightCycler-Analysen durchgeführt. Zur Untersuchung der anti-inflammatorischen Aktivität von CTRP-3 *in vivo* wurde den Mäusen 30 min vor LPS-Gabe 1 bzw. 10 µg CTRP-3 (in PBS) pro Maus intraperitoneal (ip) verabreicht. Die Tierversuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Frank Hanses (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg) entsprechend den ethischen Richtlinien des Universitätsklinikums Regensburg und mit Genehmigung der örtlichen Tierethikkommission durchgeführt.

2.2.7 Statistische Auswertungen

Die Mittelwerte \pm SEM (*Standard Error of the Mean* = Standardfehler des Mittelwertes) wurden in Microsoft Office Excel 2003 nach der Statistik des Student's t-test sowie in SPSS 15 bzw. 17 mit Mann-Whitney-U-Test, Chi-Quadrat-Test und Pearson-Korrelation durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ betrachtet und präzise angegeben bzw. mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Die Diagramme wurden in SPSS 15 bzw. 17 erstellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 CTRP-3 - Expression und Funktion in Adipozyten

Initial wurde CTRP-3 mRNA in Knorpel und Niere von Mäusen nachgewiesen [84]. Auf Proteinebene zeigte sich in Folge-Publikationen ein breites Expressionsmuster in humanen Geweben, vor allem in Lunge, Milz, Leber und Niere [89].

Als Hauptquelle der CTRP-3 Expression wird jedoch das Fettgewebe angesehen. Auf mRNA-Ebene lässt sich die größte Menge von CTRP-3 im Fettgewebe detektieren [77]. Zusätzlich zeigten Untersuchungen an synovialen Adipozyten bereits im Jahr 2003 eine deutliche Expression von CTRP-3 mRNA [88]. Das Vorhandensein eines N-terminalen Signalpeptids und der Nachweis von CTRP-3 im Serum [90] führten zur Einordnung in die Gruppe der Adipokine.

Auf mRNA- und Protein-Ebene sollte in dieser Arbeit zunächst in der murinen Fibroblasten-Zelllinie 3T3-L1, die ein anerkanntes Modell zur Differenzierung von Adipozyten darstellt [101, 110], die Expression von CTRP-3 im Rahmen der Zelldifferenzierung untersucht werden. In humanen Adipozyten fand eine Analyse der Proteinexpression von CTRP-3 im Hinblick auf das Reifestadium der Zellen, die Fettgewebsdepot-Verteilung sowie in Abhängigkeit des BMI statt. Ferner interessierte die Signaltransduktion, die durch CTRP-3 in Adipozyten (am Beispiel von 3T3-L1 Zellen) in Gang gesetzt wird. Genauere Untersuchungen zur Rolle von CTRP-3 in Adipozyten ließen sich durch Knockdown-Versuche anhand der Zelllinie 3T3-L1 durchführen. Außerdem war es ein Schwerpunkt der Arbeit, die anti-inflammatorische Wirkung von CTRP-3 in Adipozyten zu untersuchen.

3.1.1 CTRP-3 Expression in Adipozyten

3.1.1.1 CTRP-3 Expression während der Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten

Über das Stadium der Präadipozyten lassen sich 3T3-L1 Zellen zu reifen Adipozyten differenzieren, die durch die Einlagerung von Triglyzeriden in Form von Lipidtröpfchen einen verfetteten Phänotyp ausbilden. Die erfolgreiche Differenzierung von 3T3-L1 Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert (siehe Abb. 6).

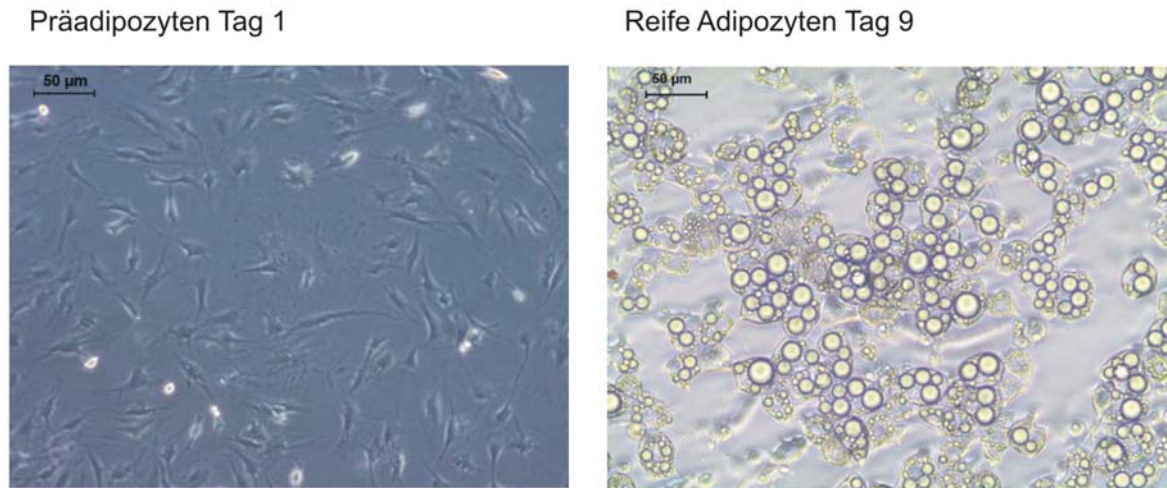


Abbildung 6: Lichtmikroskopische Aufnahme der Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten Tag 1 (links) zu reifen Adipozyten Tag 9 (rechts). 200fache Vergrößerung, Balken 50 µm.

Im Verlauf der Differenzierung werden adipozytenspezifische Gene induziert, wie *CCAAT/enhancer Binding Protein alpha, beta und delta* (C/EBP α , β und δ), *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma* (PPAR γ), und Enzyme wie *Fatty Acid Synthase* (FAS), *Stearoyl-CoA Desaturase 1* (SCD1) und *Adipose Triglyceride Lipase* (ATGL).

Sowohl auf mRNA- als auch Protein-Ebene konnte eine zunehmende Expression von CTRP-3 während der Reifung der Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 7). CTRP-3 ließ sich hier stets als ca. 90 kDa schweres Protein, also in seiner trimeren Form, detektieren. Auf Protein-Ebene erfolgte zum Vergleich eine Expressionsanalyse von relevanten Proteinen bzw. Transkriptionsfaktoren der Adipogenese. Diese Analyse diente zur Verifizierung des Modells der 3T3-L1 Zellen und zur Einordnung des zeitlichen Verlaufs der CTRP-3 Expression. Abbildung 7 identifiziert CTRP-3 als späten Marker der Differenzierung. Seine Proteinexpression lässt sich ab Tag 2 der Differenzierung schwach nachweisen, eine starke Induktion findet erst ab Tag 7 statt.

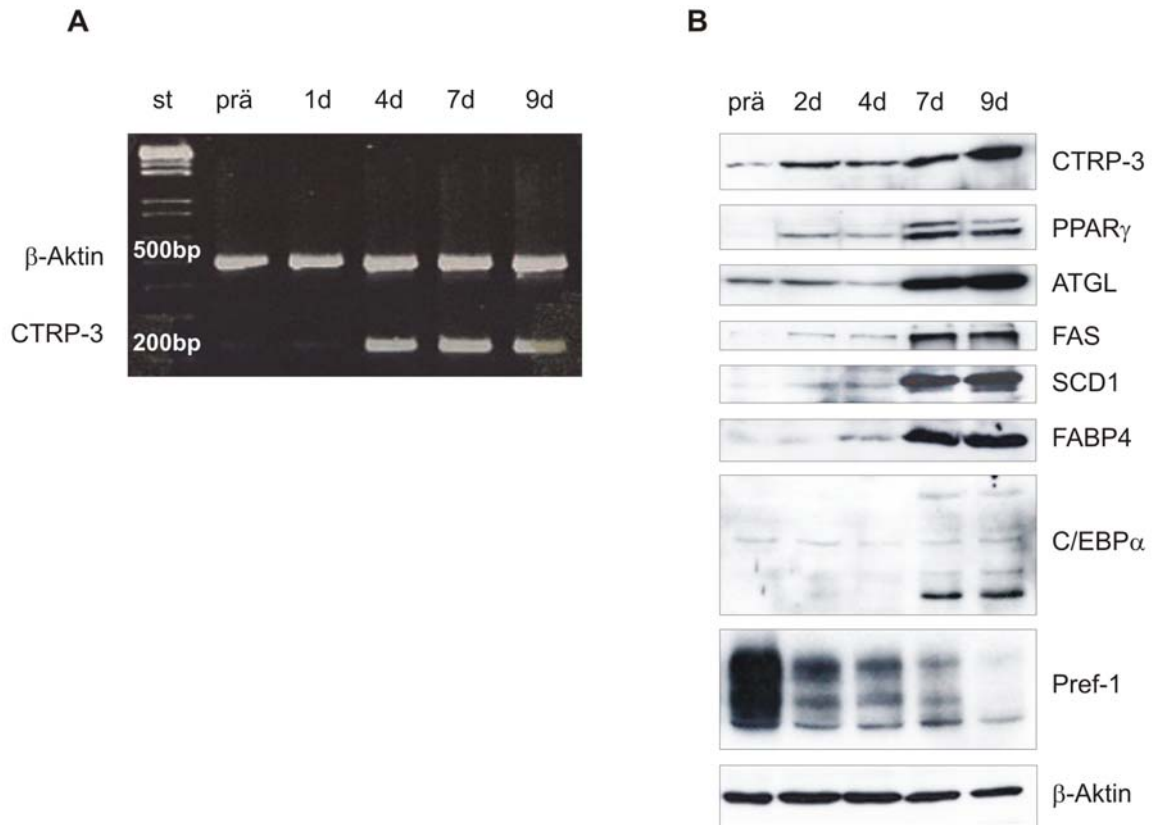


Abbildung 7: Differenzierung von 3T3-L1 Zellen. Die Zellen wurden als Präadipozyten (prä) bzw. an Tag 1 bzw. 2, 4, 7 und 9 der Differenzierung geerntet.
 (A) Analyse der mRNA Expression von CTRP-3 (227 bp) und β -Aktin (453 bp) als Kontrolle (RT-PCR). (st = 1-kb DNA Molekulargewichtsleiter).
 (B) Analyse der Proteinexpression von CTRP-3, PPAR γ , ATGL, FAS, SCD1, FABP4, C/EBP α und Pref-1 während der Adipozyten-Differenzierung. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

3.1.1.2 CTRP-3 Expression in humanen Adipozyten

Humane Präadipozyten von gesunden, normalgewichtigen Spendern wurden von der Firma BioCat bezogen und mit den entsprechenden Medien nach Angaben des Herstellers zu reifen Adipozyten differenziert. Nach 14 Tagen hatten die Zellen zahlreiche Lipidtröpfchen ausgebildet. Üblicherweise waren die Lipidtröpfchen im humanen System kleiner als in 3T3-L1 Zellen. Mikroskopisch ließ sich der Verlauf der Differenzierung beobachten (siehe Abb. 8).

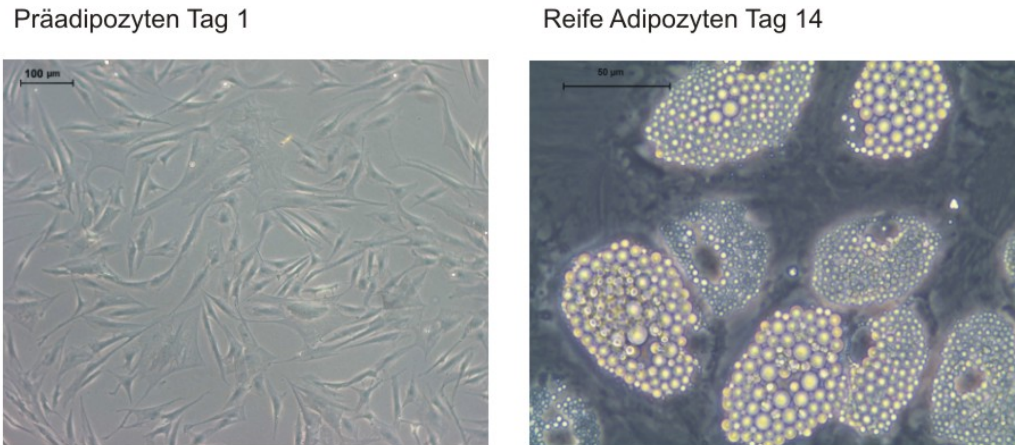


Abbildung 8: Lichtmikroskopische Aufnahme der Differenzierung von humanen Präadipozyten (links, 100fache Vergrößerung, Balken 100 µm) aus einem gesunden Spender zu reifen Adipozyten (rechts, 400fache Vergrößerung, Balken 50 µm).

3.1.1.2.1 CTRP-3 Expression in humanen Präadipozyten und reifen Adipozyten aus gesunden Spendern

Anhand Western-Blot wurde die Proteinexpression von CTRP-3 in humanen Adipozyten im Vergleich zu Präadipozyten analysiert. Hier zeigte sich ähnlich wie bei 3T3-L1 Adipozyten eine erhöhte Proteinmenge bei ausgereiften Fettzellen, während Präadipozyten kein CTRP-3 exprimierten (siehe Abb. 9).

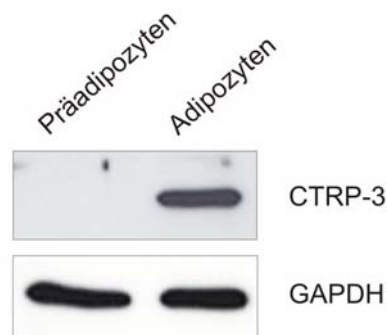


Abbildung 9: Western-Blot: Expression von CTRP-3 in humanen Präadipozyten und reifen Adipozyten eines exemplarischen, normalgewichtigen Spenders nach 14 Tagen Differenzierung. β -Aktin diente als Ladungskontrolle.

3.1.1.2.2 CTRP-3 Expression in subkutanen und viszeralen Adipozyten in Abhängigkeit vom BMI

Um einen tieferen Einblick in die differenzielle Expression von CTRP-3 in unterschiedlichen Fettgewebsdepots und seine Abhängigkeit vom BMI und dem Typ 2 Diabetes zu erhalten, fand eine Analyse von Adipozyten-Lysaten aus subkutanem und viszeralem Fettgewebe aus Spendern mit unterschiedlichem BMI statt. Die Lysate wurden von der Firma BioCat erworben (siehe 2.1.13) und sollten exemplarisch einen ersten Einblick in die differenzielle Expression von CTRP-3 geben.

Bei den Western-Blot Analysen zeigte sich in subkutanen Adipozyten tendenziell eine Zunahme der CTRP-3 Expression bei ansteigendem BMI der Spender, aus denen die Adipozyten isoliert wurden (Abb. 10A). Zusätzlich ließ sich anhand der untersuchten Zelllysate eine schwächere Expression von CTRP-3 in Adipozyten aus viszeralem Fettgewebe im Vergleich zu subkutanen Adipozyten nachweisen (Abb. 10B). Die Proben waren jedoch nicht gepaart, sondern aus unterschiedlichen Spendern isoliert, sodass eine Variabilität von Person zu Person bedacht werden muss.

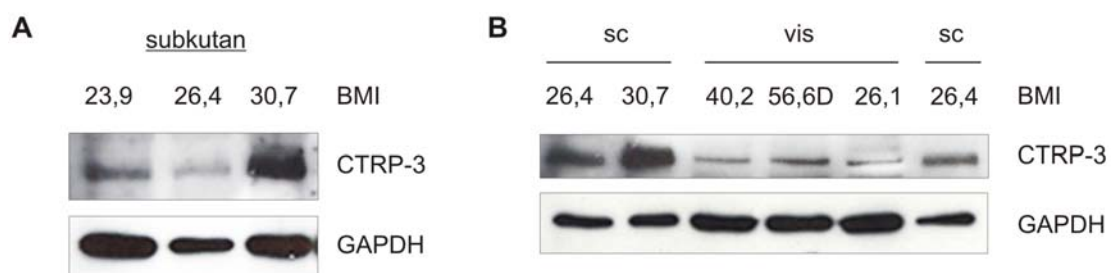


Abbildung 10: CTRP-3 Expression in subkutanen Adipozyten in Abhängigkeit des BMI (A). B zeigt einen Vergleich zwischen subkutanen und viszeralen Adipozyten aus Spendern mit unterschiedlichen BMIs. D=Typ 2 Diabetiker. GAPDH diente als Beladungskontrolle.

Die Menge an CTRP-3 in Adipozyten aus viszeralem Fett war, wie die exemplarischen Western-Blots zeigen, unabhängig vom BMI. Die Adipozyten aus einem Spender mit Diabetes-Erkrankung wurde jedoch eine leicht erhöhte CTRP-3 Expression festgestellt.

3.1.2 Stimulation von 3T3-L1 Adipozyten mit rekombinantem CTRP-3

Für Stimulationsversuche wurde stets rekombinantes humanes CTRP-3 verwendet, das mit Hilfe des Baculovirus-Systems exprimiert wurde. Es handelt sich hierbei um eine in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Methode [89].

Für eine erneute Expression von CTRP-3 wurden H5-Überstände, die rekombinante Baculoviren enthielten, verwendet und diese zur Infektion von frisch kultivierten H5-Zellen eingesetzt. Nach 4-tägiger Kultivierung der Zellen bei 27°C war es möglich, aus den gewonnenen Überständen rekombinantes CTRP-3 mithilfe einer Affinitätsmatrix aufzureinigen (siehe 2.2.6).

Abbildung 11A zeigt ein SDS-Gel der Elutionsfraktionen (Silberfärbung) nach der Affinitätsreinigung von CTRP-3. Hierbei konnte die Reinheit der Fraktionen überprüft werden. Das rekombinante Protein lag in seiner trimeren Isoform vor. Alle sauberen Eluate wurden vereint dialysiert, anschließend sterilfiltriert und nach Bestimmung ihrer Proteinkonzentration bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Mit Hilfe des Western-Blot erfolgte der spezifische Nachweis von CTRP-3 mittels spezifischem CTRP-3 Antikörper. Dabei wurde zusätzlich rekombinantes Adiponektin als Negativkontrolle aufgetragen (Abb. 11B).

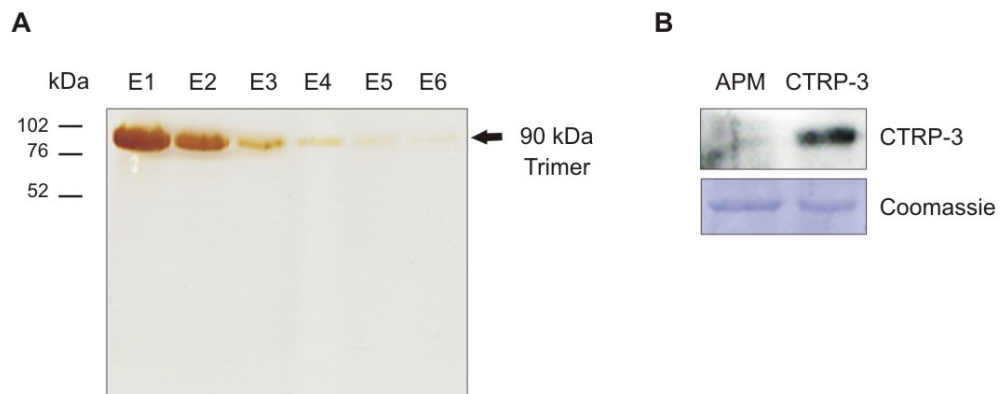


Abbildung 11: (A) SDS-Gel nach Silberfärbung. Je 10 µl der Eluate (E1 bis E6) der CTRP-3 Affinitätsreinigung wurden aufgetragen. (B) Western-Blot zur Überprüfung der Proteinexpression. Je 1 µg/ml Adiponektin (APM) und CTRP-3 wurden aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit anti-CTRP-3 AK. Die Beladung wurde mittels Coomassie-Färbung überprüft.

3.1.2.1 Signaltransduktion von CTRP-3 in 3T3-L1 Adipozyten

Die Signalwege, die in Adipozyten durch CTRP-3 aktiviert werden, sind noch nicht bekannt. Für erstmalige Untersuchungen des CTRP-3 Signalings wurde die Zelllinie 3T3-L1 verwendet. Dazu erfolgte eine Stimulation der reifen Adipozyten für 0, 5, 10, 30, 60 und 120 min mit 1 µg/ml CTRP-3. Nach Zellernte wurde eine Western-Blot Analyse der Zelllysate angeschlossen. Dabei wurden Signalwege betrachtet, die für CTRP-3 bereits in anderen Zelltypen bekannt sind. An Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen ist

die Aktivierung von ERK1/2 und p38 MAPK beschrieben [93-94]. Eine wichtige Schaltstelle im Signaling von Adiponektin, als Paralogon zu CTRP-3, stellt die AMPK dar [67]. Diese Moleküle und ihre aktivierten Phospho-Formen wurden in Western-Blot Experimenten analysiert (siehe Abb. 12).

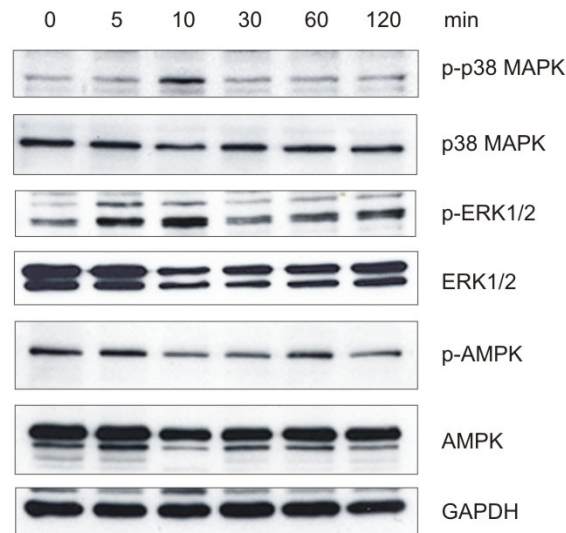


Abbildung 12: Western-Blot Analyse der durch CTRP-3 induzierten Signalwege in 3T3-L1 Adipozyten. GAPDH wurde als Ladungskontrolle verwendet.

Die Analysen legten dar, dass eine Behandlung der Zellen mit CTRP-3 zur Induktion der ERK1/2-Phosphorylierung führte. Der Effekt wurde bereits nach einer 5-minütigen Inkubation mit CTRP-3 deutlich und schwächte nach 30 min wieder auf den Ausgangszustand ab. Zusätzlich stieg die Menge an phosphorylierter p38 MAPK nach 10 Minuten deutlich an. Eine Beteiligung der AMPK an der Signaltransduktion von CTRP-3 in Adipozyten ließ sich anhand der Ergebnisse nicht nachweisen. Zusätzlich wurden die Signalwege JNK1/2 und PI3K/Akt untersucht. Diese Signalmoleküle waren von CTRP-3 nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

3.1.2.2 Stimulation von 3T3-L1 Zellen mit CTRP-3 und die Auswirkung auf die Adipokin-Sekretion

Anhand über Nacht (ÜN)-Stimulationen wurde der Einfluss von CTRP-3 auf die Adipokin-Freisetzung in 3T3-L1 Adipozyten untersucht. Dazu erfolgte eine Behandlung der reifen Zellen mit verschiedenen Konzentrationen CTRP-3 oder der entsprechenden Menge an PBS als Kontrolle für 18 h.

In den Zellüberständen wurde anschließend mittels ELISA die Konzentration der Adipokine Adiponektin und Resistin bestimmt (siehe Abb. 13). Die Experimente machten deutlich,

dass die Behandlung mit CTRP-3 zu einer Induktion der Adipokin-Freisetzung aus reifen Adipozyten führt. Bereits geringe Mengen CTRP-3 (ab 10 ng/ml) hatten signifikante Effekte ($p = 0,001$) auf die Sekretion von Adiponektin und Resistin.

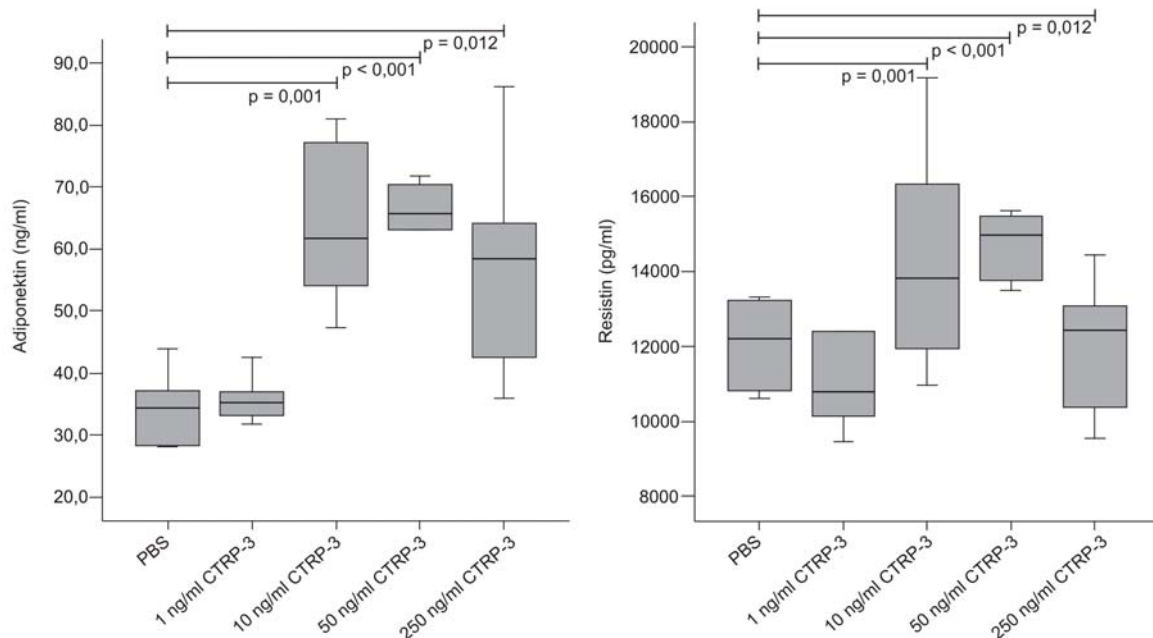


Abbildung 13: Auswirkung einer ÜN-Stimulation mit CTRP-3 (1- 250 ng/ml) auf die Adiponektin- und Resistin-Freisetzung aus 3T3-L1 Adipozyten (ELISA). $n=6$.

3.1.3 Anti-inflammatorische Effekte von CTRP-3 in Adipozyten

3.1.3.1 Anti-inflammatorische Effekte in 3T3-L1 Adipozyten

Zur Charakterisierung des anti-inflammatorischen, immunmodulierenden Potentials von CTRP-3 wurden reife 3T3-L1 Adipozyten mit verschiedenen pro-inflammatorischen Stimuli behandelt, die im Kontext der Adipositas eine Rolle spielen. Eine Stimulation der Zellen mit 20 ng/ml bakteriellem LPS für 18 h führte zu einer starken Induktion der MCP-1 Freisetzung ($p < 0,001$) (siehe Abb. 14A). Dieser Effekt ließ sich durch die Gabe CTRP-3 dosisabhängig antagonisieren. Zu diesem Zweck erfolgte eine Vorbehandlung der Zellen mit 0,1, 1 bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ CTRP-3 60 min vor LPS-Gabe. 1 $\mu\text{g/ml}$ CTRP-3 bewirkte eine signifikante Reduktion der MCP-1 Freisetzung ($p = 0,004$). Bei Behandlung mit der höchsten Dosis wurde der LPS Effekt auf die MCP-1 Induktion fast vollständig aufgehoben ($p < 0,001$).

Als weiterer relevanter pro-inflammatorischer Aktivator wurde Laurinsäure, eine gesättigte Fettsäure verwendet, die nicht nur als freie Fettsäure, sondern auch als Komponente von LPS eine bedeutende Rolle spielt. Der Lipidanteil des LPS, das sog. Lipid A, bildet den

inneren Bereich von LPS und wird als die Endotoxin-Komponente bezeichnet. Es stellt den Anteil mit der höchsten biologischen Aktivität von LPS dar. Fettsäuren sind durch Esterbindungen an ein Disaccharid aus *N*-Acetylglucosaminphosphat gebunden [111]. Einige der häufigsten Fettsäuren, die in Lipid A vorkommen, sind Myristinsäure, Palmitinsäure und Laurinsäure. Laurinsäure allein ist ebenso wie LPS in der Lage, an TLR4 zu binden und so das NF κ B-Signaling in Makrophagen effektiv zu aktivieren [112].

3T3-L1 Adipozyten wurden durch Behandlung mit 200 μ M Laurinsäure pro-inflammatorisch aktiviert, was zur signifikant erhöhten MCP-1 Freisetzung in den Zellüberstand ($p<0,001$) führte. Dieser Effekt ließ sich durch die prophylaktische Gabe von 1 μ g/ml CTRP-3 signifikant herabsenken ($p<0,001$) (siehe Abb. 14B).

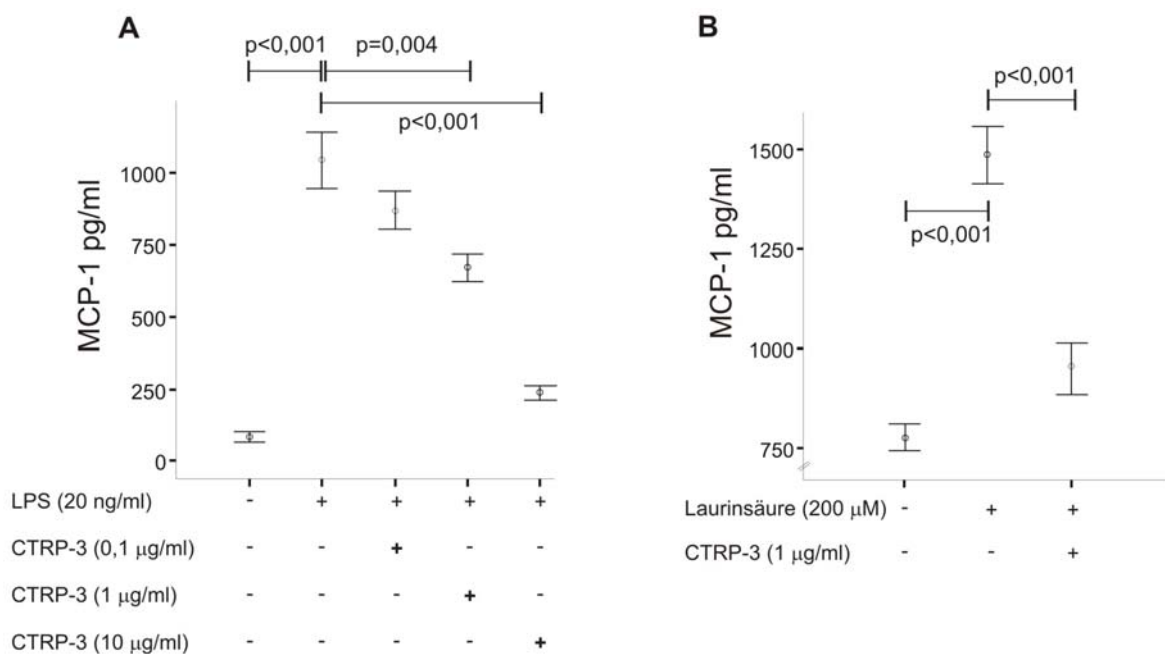


Abbildung 14: Stimulation von 3T3-L1 Zellen mit LPS (A) bzw. Laurinsäure (B) für 18 h unter Vorbehandlung (60 min) mit verschiedenen Konzentrationen rekombinanten CTRP-3. Die MCP-1 Freisetzung im Zellüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. n=9.

Zahlreiche weitere Toll-like Rezeptor-Liganden sind zur pro-inflammatorischen Aktivierung von Adipozyten in der Lage [31]. Poly (I:C) als Ligand für TLR3, stellt ein synthetisches Analogon zu doppelsträngiger RNA dar und wird verwendet, um eine virale Infektion zu imitieren [113]. Pam3Cys (auch Pam₃CSK₄ = Pam₃-Cystein-Serin-(Lysin)₄) ist ein synthetisches tripalmitoyliertes Lipopeptid, das als Ligand für TLR1/2 Heterodimere und somit als Analogon für bakterielle Lipoproteine eingesetzt wird.

Eine ÜN-Stimulation mit Poly (I:C) (Abb. 15A) und Pam3Cys (Abb. 15B) resultierte in einer signifikant erhöhten MCP-1 Sekretion in den Zellüberständen ($p<0,001$). Die Vorbehandlung der Zellen mit CTRP-3 hatte auch hier eine dosisabhängige Verminderung des pro-inflammatorischen Effektes auf die Adipozyten zur Folge. Ab einer Konzentration von 1 µg/ml CTRP-3 zeigte sich eine statistisch signifikant erniedrigte MCP-1 Sekretion für beide Stimuli ($p<0,03$). Die höhere Dosis wies eine noch effektivere Wirkung auf ($p=0,001$) und führte im Fall von Pam3Cys zur fast vollständigen Aufhebung der MCP-1 Induktion ($p=0,008$) (siehe Abb. 15).

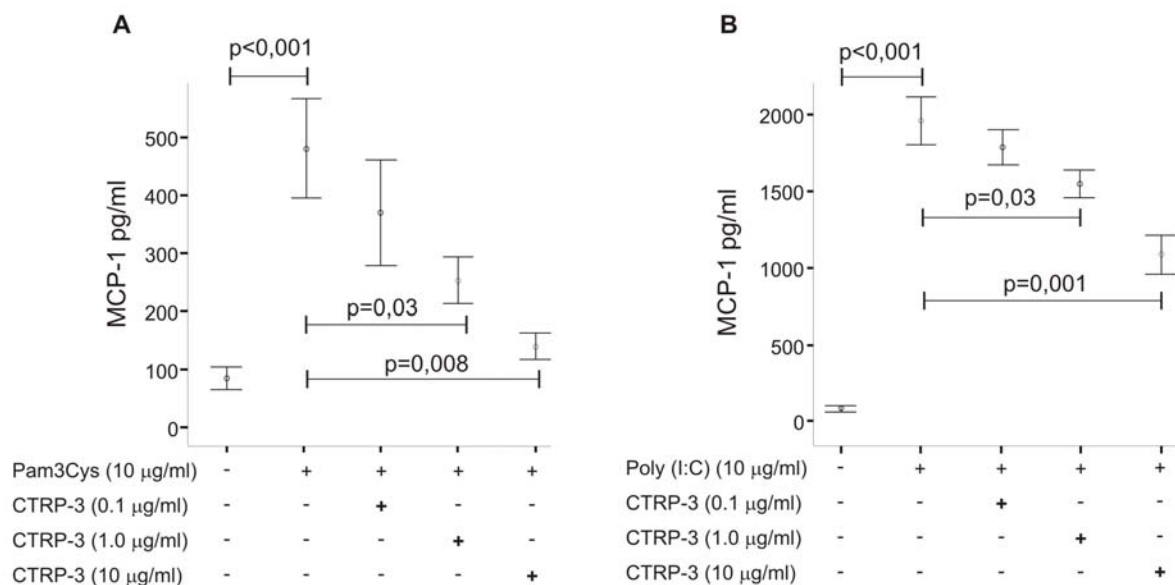


Abbildung 15: Stimulation von 3T3-L1 Zellen mit Pam3Cys (A) bzw. Poly (I:C) (B) für 18 h unter Vorbehandlung (60 min) mit verschiedenen Konzentrationen rekombinanten CTRP-3. Die MCP-1 Freisetzung im Zellüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. n=9.

3.1.3.2 Anti-inflammatorische Effekte in humanen Adipozyten

Humane Präadipozyten aus gesunden Spendern ließen sich durch *in vitro* Differenzierung zu Adipozyten ausreifen. Am Beispiel zweier Spender wurde die anti-inflammatorische Wirkung von CTRP-3 nach LPS (50 ng/ml) und Pam3Cys (100 ng/ml) Stimulation im humanen System überprüft.

Die humanen Adipozyten konnten durch die TLR-Liganden zur Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine aktiviert werden. Die Gabe von Pam3Cys induzierte die MCP-1 Sekretion von $807,0 \pm 89,2$ pg/ml auf $2825,4 \pm 230,6$ pg/ml ($p=0,001$). LPS verursachte eine Induktion von MCP-1 von $1235,7 \pm 534,5$ pg/ml auf $13717,8 \pm 1711,8$ pg/ml. In einer 60-minütigen Vorinkubation wurde CTRP-3 (1 µg/ml) verabreicht. Für Pam3Cys hatte dies

eine signifikante Reduktion der Konzentration von MCP-1 im Zellüberstand auf $1024,4 \pm 264,3$ pg/ml. ($p=0,003$) zur Folge (siehe Abb. 16A). CTRP-3 in Kostimulation mit LPS bewirkte ebenso eine deutliche Verminderung der MCP-1 Freisetzung (auf $7747,2 \pm 1631,8$ pg/ml), jedoch reichte aufgrund begrenzten Materials die Anzahl der Fälle nicht aus, um eine statistische Signifikanz zu erlangen ($p=0,065$) (siehe Abb. 16B).

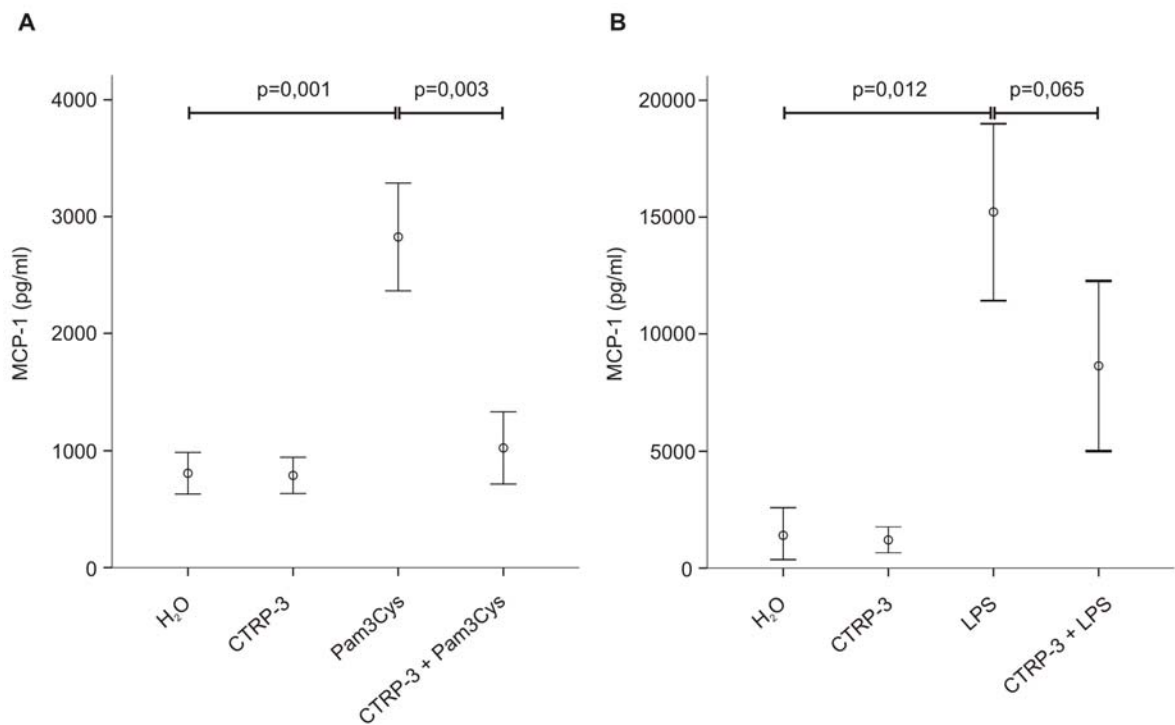


Abbildung 16: Stimulation von reifen humanen Adipozyten aus zwei Spendern mit (A) Pam3Cys (100 ng/ml) und (B) LPS (50 ng/ml) in Kostimulation (60 min Vorbehandlung) mit 1 µg/ml CTRP-3. Im Zellüberstand wurde mittels ELISA die MCP-1 Konzentration bestimmt. Statistische Berechnung: Student's t-Test. n=3.

3.1.4 Knockdown von CTRP-3 in 3T3-L1 Adipozyten

Um den Einfluss von CTRP-3 auf die Adipozytenfunktion und Adipozyten-Differenzierung detaillierter zu untersuchen, wurde mit Hilfe von siRNA ein Knockdown von CTRP-3 durchgeführt (2.2.1.5.4). Von Interesse waren hierbei die Effekte auf die Adipokin-Freisetzung und die Auswirkungen auf den inflammatorischen Zustand der Zellen. Die Präadipozyten wurden dabei mit Kontroll-siRNA (Ksi) oder einer murinen CTRP-3 spezifischen siRNA (ein Gemisch aus 3 siRNAs) (Csi) am Tag der Differenzierungsinitiierung transfiziert (siehe 2.1.13). Die Überprüfung der Überlebensrate der Zellen erfolgte mittels LDH-Cytotoxizitätstest (siehe 2.2.4.8) nach 24 h. Nach der üblichen Differenzierung folgte die Ernte der Zellen. Auf Western-Blot Ebene zeigte sich

durch die CTRP-3 siRNA Behandlung eine deutliche Abnahme der CTRP-3 Expression (siehe Abb. 17).

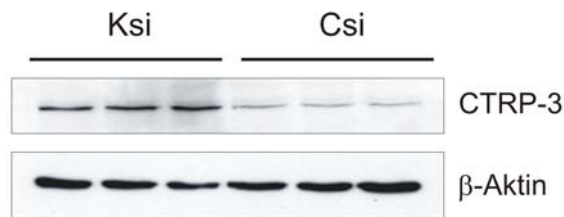


Abbildung 17: Western-Blot: Knockdown von CTRP-3 mittels muriner CTRP-3 siRNA (Csi) bzw. Kontroll siRNA (Ksi). β-Aktin diene als Beladungskontrolle.

3.1.4.1 Einfluss des Knockdown auf den zellulären Phänotyp

Der Knockdown von CTRP-3 in 3T3-L1 Zellen führte zu einem veränderten Phänotyp der Adipozyten. Die Lipidtröpfchen der Zellen waren stark verkleinert. Reife Adipozyten sind üblicherweise univakuolär bis plurivakuolär, d.h. ihr Inneres besteht aus einem oder wenigen großen Lipidtropfen. So befanden sich bei Kontrolltransfuzierten Zellen wenige große Lipidtröpfchen in den Zellen. Nach CTRP-3 Knockdown jedoch waren zahlreiche kleinere Tröpfchen in den Zellen zu finden (siehe Abb. 18). Die Lipidtröpfchen wurden durch Oil red O Färbung visualisiert und mikroskopische ausgemessen. Dazu wurden pro Ansatz aus jeweils fünf Aufnahmen 50 und 80 Tröpfchen-Durchmesser bestimmt. Anschließend erfolgte ein Vergleich der Mittelwerte der Kontroll siRNA mit den Mittelwerten der CTRP-3 siRNA behandelten Zellen.

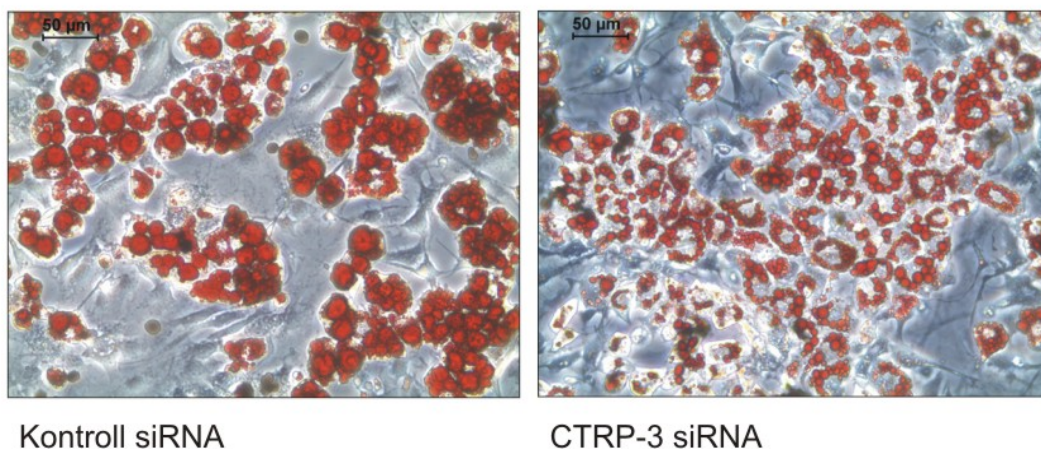


Abbildung 18: 3T3-L1 Adipozyten nach CTRP-3 Knockdown. Färbung mit Oil Red O. Vergrößerung 200fach. Balken 50 μm.

Der Mittelwertvergleich ergab signifikant verringerte Lipidtröpfchen-Durchmesser nach CTRP-3 Knockdown ($p < 0,001$). Bei den Kontroll-Zellen lag der Durchmesser durchschnittlich bei $16,0 \mu\text{m}$ ($\pm 0,59 \mu\text{m}$), während die Zellen nach Knockdown von CTRP-3 im Durchschnitt nur noch $8,9 \mu\text{m}$ ($\pm 0,41 \mu\text{m}$) große Lipidtröpfchen einlagerten (Abb. 19A).

In den Lipidtropfen werden hauptsächlich Triglyzeride gespeichert, weshalb eine verminderte Lipidtröpfchengröße sich auch im Nachweis der intrazellulären Triglyzeride widerspiegelte (Abb. 19B). So ließen sich in den Zellen nach CTRP-3 Knockdown im Vergleich zu den Kontroll-Zellen signifikant reduzierte Mengen an eingelagerten Triglyzeriden detektieren ($p = 0,037$). Diese Ergebnisse deuten auf einen Einfluss des Knockdown auf die Differenzierungsaktivität der Zellen hin. Durch die verminderte CTRP-3 Expression scheinen die Zellen nicht mehr in der Lage zu sein, vollständig auszureifen.

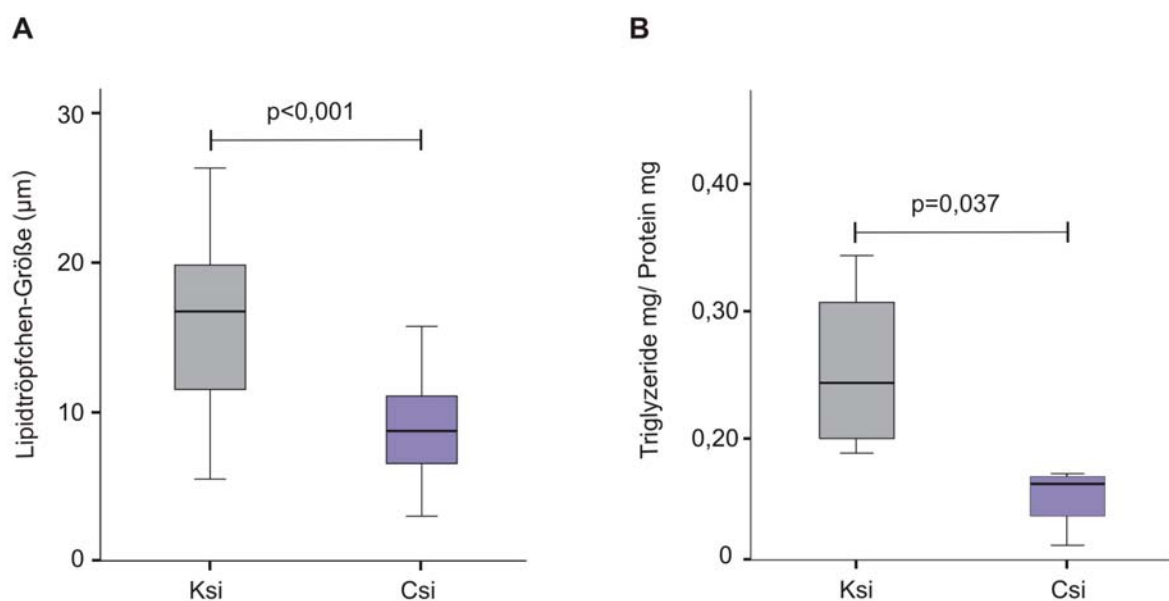


Abbildung 19: (A) Analyse der Durchmesser der Lipidtröpfchen nach CTRP-3 Knockdown, $n = 69-77$. (B) Bestimmung der intrazellulären Triglyzeride bezogen auf Gesamt-Zellprotein (rechnerische Einheiten), $n = 6$.

3.1.4.2 Einfluss des CTRP-3 Knockdown auf die Sekretion von Adipokinen und Zytokinen

Um die Hypothese des verminderten Differenzierungsgrades nach CTRP-3 Knockdown zu überprüfen, erfolgte eine Messung der freigesetzten Adipokin-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen. Für die Adipokine Adiponektin und Resistin wurde ersichtlich, dass deren Freisetzung in den Überstand signifikant erniedrigt war (siehe Abb. 20).

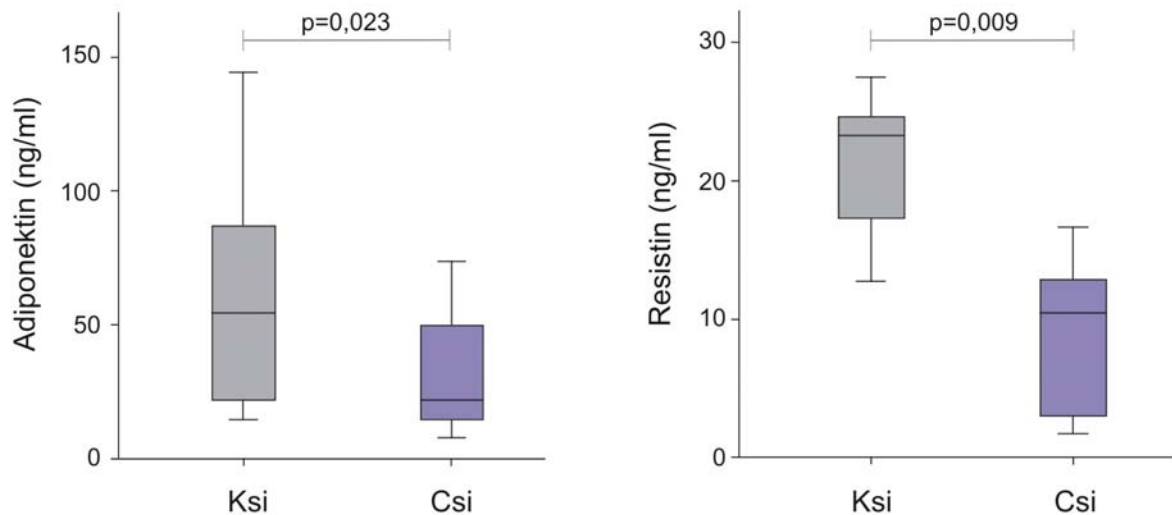


Abbildung 20: Messung der Adipokine Adiponektin (n=16) und Resistin (n=7) im Zellüberstand von 3T3-L1 Zellen nach CTRP-3 Knockdown mittels ELISA.

Beide Adipokine werden in höchstem Maße von reifen Adipozyten gebildet und sind in weniger stark ausdifferenzierten Zellen in verringerten Konzentrationen vorhanden [64].

Der Einfluss auf die Chemokin-Freisetzung zeigte sich mittels Bestimmung der MCP-1 Konzentration. Die MCP-1 Freisetzung war nach CTRP-3 Knockdown signifikant erhöht, was für einen pro-inflammatorischen Phänotyp der Zellen spricht (siehe Abb. 21).

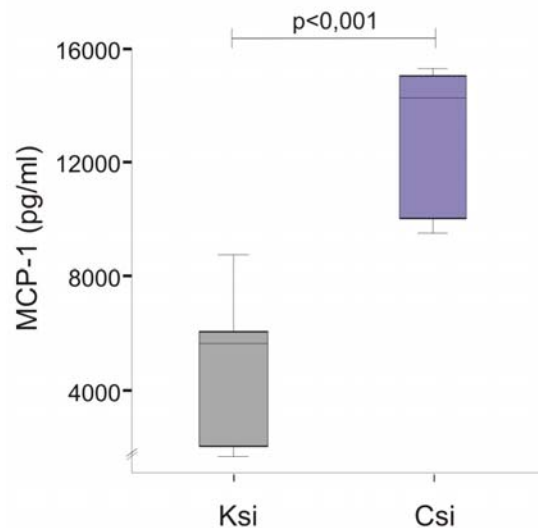


Abbildung 21: Bestimmung der MCP-1 Konzentration im Zellüberstand von 3T3-L1 Zellen nach Knockdown von CTRP-3 mittels ELISA. n=9.

3.1.4.3 Einfluss des CTRP-3 Knockdown auf den Lipidstoffwechsel und die Adipogenese

In den Überständen der Zellen, die dem CTRP-3 Knockdown unterzogen wurden, wurde weiterhin der Gehalt an freiem Glycerol überprüft. Die Menge an freiem Glycerol lässt Rückschlüsse auf die Lipolyserate der Zellen ziehen.

Dabei wurde zum einen die basale Lipolyse, aber auch die induzierte Lipolyse untersucht, die durch eine Stimulation mit Epinephrin (500 nM, 3 h) als Stimulus der β -adrenergen Rezeptoren erfolgte.

Anhand der Analysen ließ sich eine verminderte Lipolyserate nach CTRP-3 Knockdown in den Fettzellen nachweisen. Sowohl die Kontrolltransfizierten Zellen als auch die Zellen, die mit CTRP-3 spezifischer siRNA behandelt wurden, waren grundsätzlich in ihrer Lipolyse induzierbar ($p=0,004$). Jedoch wiesen die Zellen mit CTRP-3 Knockdown jeweils geringere Mengen an freigesetztem Glycerol im Überstand auf (basal von $0,16 \pm 0,01$ mM auf $0,12 \pm 0,007$ mM ($p=0,013$) und induziert von $0,23 \pm 0,01$ mM auf $0,18 \pm 0,01$ mM ($p=0,010$)). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass CTRP-3 defiziente Zellen den Abbau von Triglyceriden einschränken (Abb. 22) bzw. der unreife Phänotyp der Adipozyten aufgrund seiner zellulären Ausstattung lediglich zu einer mäßigen Lipolyserate imstande ist.

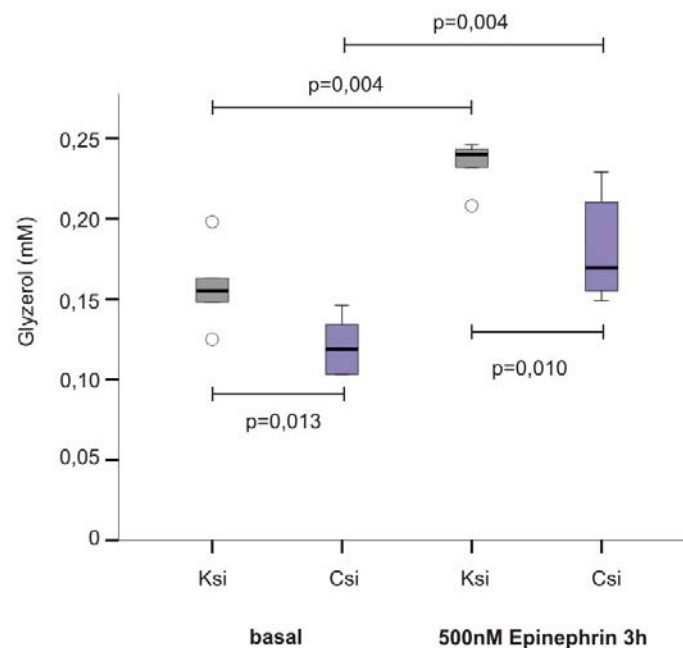


Abbildung 22: Analyse der basalen und Epinephrin-induzierten Lipolyserate in 3T3-L1 Zellen nach CTRP-3 Knockdown. Glycerol wurde in den Zellüberständen detektiert. $n=6$.

Um die für die Lipolyse nötige Enzymausstattung der Zellen zu überprüfen, wurden die an diesem Prozess beteiligten Enzyme Hormon-sensitive Lipase (HSL) und ATGL mittels

Western-Blot im Rahmen des CTRP-3 Knockdown analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die Proteinmenge von ATGL mit CTRP-3 Verminderung stark absinkt. Auch die HSL wies eine leicht reduzierte Expression auf (siehe Abb. 22).

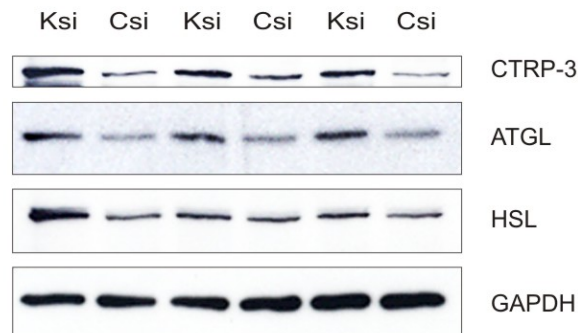


Abbildung 23: Auswirkungen des CTRP-3 Knockdown auf die Lipasen HSL und ATGL (Western-Blot). GAPDH diente als Beladungskontrolle.

Die Auswirkungen des CTRP-3 Knockdown auf weitere Faktoren der Adipogenese wurden analysiert. Dabei ließ sich kein Einfluss auf die Transkriptionsfaktoren PPAR γ (siehe Abb. 24) und C/EBP α (nicht gezeigt), die bei der Adipozyten-Differenzierung eine entscheidende regulatorische Rolle spielen, zeigen.

FABP4, Pref-1, SCD1 oder FAS wiesen ebenso keine veränderte Expression nach Knockdown von CTRP-3 auf (Daten nicht gezeigt). Perilipin dagegen, eines der wichtigsten Proteine auf der Oberfläche der Lipidtropfen, wurde durch die CTRP-3 Defizienz stark in seiner Proteinexpression reduziert. Es schützt die Tropfen vor dem Angriff der Lipasen und somit vor dem Abbau [114] (siehe Abb. 24).

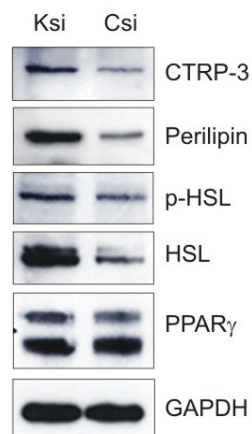


Abbildung 24: Western-Blot Analyse der Perilipin, Phospho-HSL, HSL und PPAR γ Expression von 3T3-L1 Adipozyten nach CTRP-3 Knockdown. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

Die nachfolgende Tabelle (Tab. 2) fasst die aus den Knockdown-Versuchen erhaltenen Beobachtungen zusammen.

Effekte des CTRP-3 Knockdown		
Beobachtung	Parameter	Auswirkung
Zellmorphologie	Tröpfchengröße	↓
	Triglyzerid-Speicherung	↓
Adipokin-Sekretion	Adiponektin	↓
	Resistin	↓
Zytokin-Sekretion	MCP-1	↑
Transkriptionsfaktor-Expression	PPAR γ	=
	C/EBP α	=
Lipolyse	Lipolyse-Rate	↓
	ATGL, HSL	↓
Lipidtröpfchen-assoziierte Proteine	Perilipin	↓
Fettsäure-Metabolismus Adipogenese	SCD1	=
	FAS	=
	FABP4	=
	Pref-1	=

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Experimenten des CTRP-3 Knockdown in 3T3-L1 Adipozyten.

Die Lipidtröpfchen-Größe kann Einfluss auf die Insulinsensitivität der Zelle haben. So korreliert ein hoher Gehalt an ektopischer Triglyzerid-Speicherung stark positiv mit dem Auftreten einer Insulinresistenz [115-116]. Dabei sind nicht die Triglyzeride *per se* der Grund für die schlechter werdende Insulinsensitivität. Vielmehr scheinen die Abbauprodukte (Diacylglycerin (DAG)), die durch ein Ungleichgewicht der an der Lipolyse beteiligten Enzyme entstehen, diesen Effekt zu bewirken [117].

Um den Einfluss des CTRP-3 Knockdown auf die Insulinsensitivität der Zellen zu testen, erfolgte eine Stimulation mit 50 nM Insulin für 20 min. Im Western-Blot wurde die Expression der Protein Kinase B (Akt) basal und in ihrer aktivierten Form, die durch Phosphorylierung vermittelt wird, überprüft. In beiden Fällen konnte kein Unterschied im

Expressionsniveau festgestellt werden, was für eine vergleichbare Insulinsensitivität der Kontroll siRNA und CTRP-3 siRNA behandelten Zellen spricht (Daten nicht gezeigt).

3.1.5 CTRP-3 in einem LPS-Entzündungsmodell in 3T3-L1 Adipozyten

Um die Auswirkungen einer chronischen Entzündung auf 3T3-L1 Adipozyten in Bezug auf CTRP-3 zu analysieren, wurde ein Entzündungsmodell entwickelt, das den Zustand der leichten chronischen Entzündung der Adipositas imitieren sollte. Dafür wurden 3T3-L1 Zellen ab der Initiierung der Differenzierung mit 10 ng/ml LPS behandelt. Bei jedem Mediumwechsel im Rahmen des Differenzierungsprotokolls, erfolgte eine erneute LPS-Gabe. Nach neun Tagen konnten die Zellen standardmäßig geerntet werden.

Durch Messung pro-inflammatorischer Parameter im Zellüberstand ließ sich das Modell als geeignet einschätzen. So wurde eine signifikante Zunahme der MCP-1 Konzentration im Zellüberstand detektiert (siehe Abb. 25). Die Werte stiegen von $425,2 \pm 76,4$ pg/ml auf $1234,8 \pm 271,0$ pg/ml an ($p=0,005$). Außerdem wiesen die Zellen - vergleichbar mit dem Zustand in der Adipositas - eine reduzierte Adiponektin-Sekretion auf (siehe Abb. 24). Dabei kam es zu einer Reduktion von Adiponektin von $51,4 \pm 3,4$ ng/ml auf $32,9 \pm 4,4$ ng/ml ($p=0,019$).

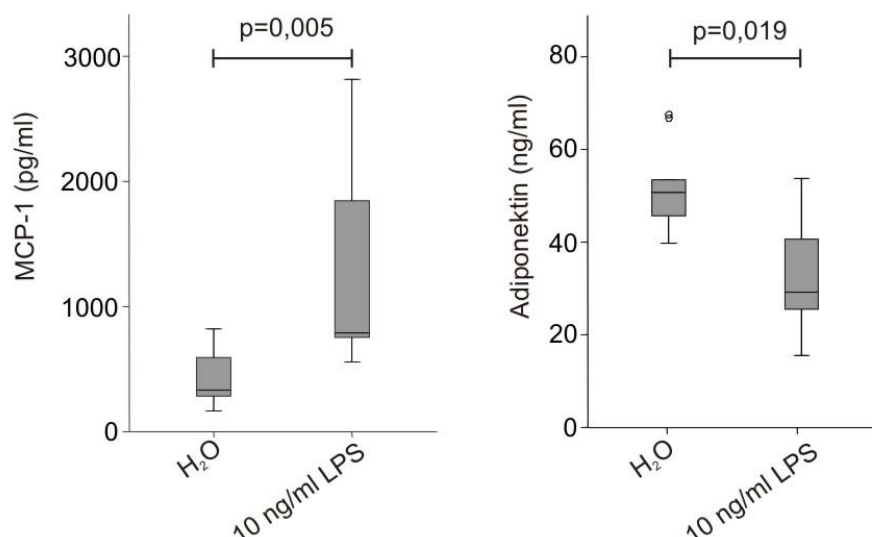


Abbildung 25: Verifizierung des LPS-induzierten Entzündungsmodells. 3T3-L1 Zellen wurden differenziert in Anwesenheit von 10 ng/ml LPS und H₂O als Lösungsmittelkontrolle von Tag 0 bis Tag 9 differenziert. Im Überstand wurden MCP-1 und Adiponektin mittels ELISA bestimmt. n=9.

Western-Blot Analysen sollten den Einfluss des Entzündungszustandes auf die CTRP-3 Expression überprüfen. Sie zeigten eine verringerte Expression des anti-inflammatorisch wirkenden Adipokins in den LPS-behandelten Zellen. Damit einhergehend wiesen die Zellen ein vermindertes Expressionsniveau der Lipasen HSL und ATGL auf (siehe Abb. 26).

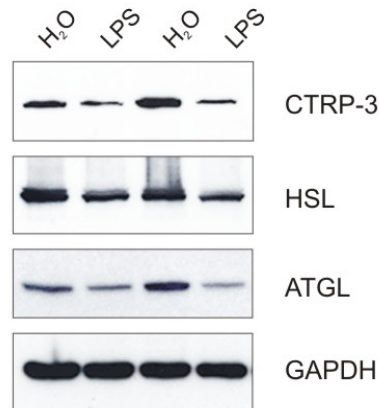


Abbildung 26: Western-Blot Analyse der CTRP-3 Proteinexpression in 3T3-L1 Zellen differenziert mit 10 ng/ml LPS und H₂O als Lösungsmittelkontrolle. Zusätzlich wurden die Lipasen HSL und ATGL überprüft. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

Bei mikroskopischer Analyse konnte im Vergleich zu Kontrollbehandelten Zellen in den Zellen mit chronischer LPS-Behandlung ein veränderter Phänotyp beobachtet werden. Kleinere Lipidtröpfchen und somit verringerte Mengen an intrazellulären Triglyzeriden wurden festgestellt. Zusätzlich ließ sich eine verminderte basale Lipolyserate anhand der reduzierten Mengen an freiem Glyzerol im Zellüberstand detektieren (siehe Abb. 27).

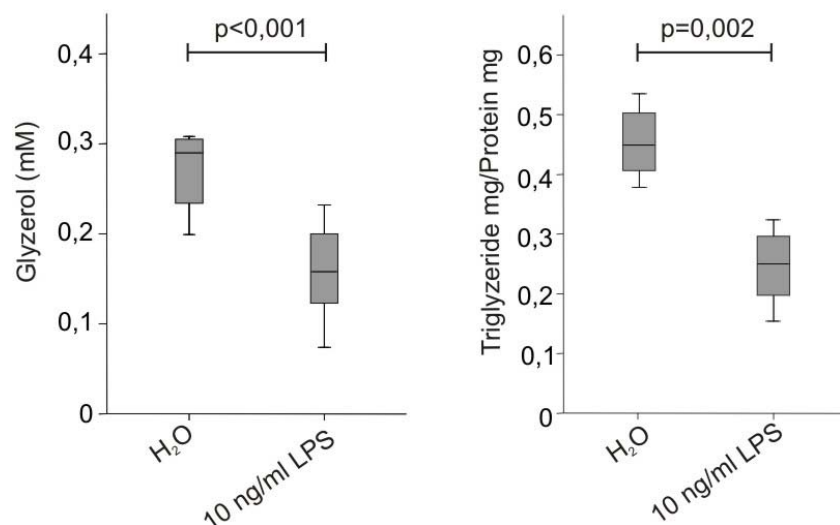


Abbildung 27: 3T3-L1 Zellen wurden differenziert in Anwesenheit von 10 ng/ml LPS und H₂O als Lösungsmittelkontrolle. Im Überstand wurden Glyzerol bestimmt. In den Zelllysaten ließen sich intrazelluläre Triglyzeride bestimmen. n=9.

Der Entzündungszustand der Zellen in diesem Modell, der mit einer Reduktion der CTRP-3 Expression einherging, verursachte also ähnlich wie im CTRP-3 Knockdown eine verminderte Differenzierung der Zellen.

3.1.6 CTRP-3 in der Infektion mit *Staphylococcus aureus*

Im Verlauf der Arbeit standen 3T3-L1 Adipozyten zur Verfügung, die für 2 h, 22 h bzw. 48 h mit *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) PS80 infiziert waren. Die Durchführung dieser Infektion fand im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Frank Hanses (Innere Medizin I, Infektiologie) statt. Die erfolgreiche Infektion (intrazelluläre Präsenz und Überleben von *S. aureus*) konnte durch Bestimmung der intrazellulären CFU (*colony forming unit*) ermittelt werden (Daten unveröffentlicht).

In diesem Infektionsmodell mit lebenden Bakterien wurde deutlich, dass die CTRP-3 Proteinexpression in den *Staphylococcus*-behandelten Zellen stark herabgesetzt wird. Nach 2-stündiger Behandlung der Zellen wurden keine Veränderung in der CTRP-3 Expression festgestellt. Erst nach 22 h wurde der Effekt der Infektion auf die Proteinmenge von CTRP-3 deutlich (siehe Abb. 28). Auch nach 48-stündiger Infektion konnten ähnliche Ergebnisse nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

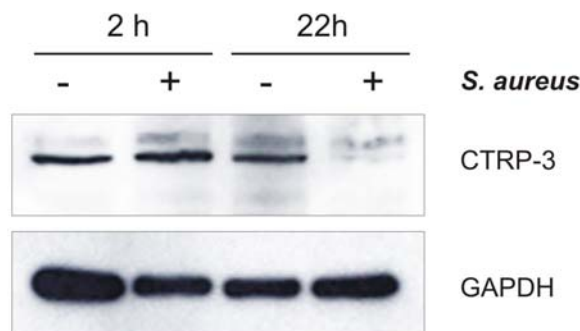


Abbildung 28: 3T3-L1 Zellen wurden für 2 h bzw. 22 h mit *Staphylococcus aureus* infiziert. Nach der Ernte der Zellen wurde in den Zelllysaten die Expression von CTRP-3 mittels Western-Blot analysiert. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

3.1.7 Auswirkungen von Insulin auf die CTRP-3 Expression in 3T3-L1 Adipozyten

Insulin wirkt als Lipolyse-hemmendes Agens, das die Adipogenese in Adipozyten fördert und zur hormonellen Differenzierung von Präadipozyten verwendet werden kann. Weiterhin ist Insulin im Krankheitsbild der Adipositas erhöht. Welche Wirkung

supraphysiologische Mengen Insulin auf die Expression von CTRP-3 in Adipozyten ausübt, sollte durch Behandlung der Zellen für 18 h überprüft werden.

3T3-L1 Adipozyten wurden dafür über Nacht mit 0,2 und 2 μM Insulin stimuliert. Dabei zeigte sich ein induktiver Effekt auf die CTRP-3 Expression. Mit steigender Dosis Insulin wurde die Menge an CTRP-3 erhöht (siehe Abb. 29).

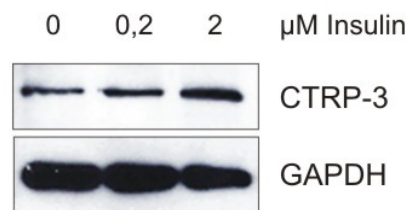


Abbildung 29: 3T3-L1 Adipozyten wurden über Nacht mit Insulin (0,2 und 2 μM) stimuliert. Die Expression von CTRP-3 wurde im Western-Blot analysiert. GAPDH diente als Beladungskontrolle.

3.2 Expression und Funktion von CTRP-3 in Monozyten

Die Expression von CTRP-3 konnte bereits in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden. Die Zelllinie COS-7, die aus Nierengewebe der Grünen Meerkatze gewonnen wurde und eine etablierte Fibroblasten-Linie darstellt, exprimiert große Mengen CTRP-3 [89]. Dagegen lassen sich nur geringe Mengen CTRP-3 in der humanen Epithelzelllinie HeLa detektieren. In der ebenfalls humanen, monozytären Zelllinie THP-1 erfolgte in Vorarbeiten ebenfalls der Nachweis von CTRP-3 [89].

3.2.1 CTRP-3 Expression in Monozyten

3.2.1.1 CTRP-3 in THP-1 Zellen und primären humanen Monozyten aus gesunden Spendern im Vergleich zu Adipozyten

Wie bereits gezeigt werden konnte, lässt sich intrazellulär CTRP-3 in THP-1 Zellen und auch primären humanen Monozyten nachweisen [89]. Ein Expressionsvergleich auf Proteinebene macht jedoch deutlich, dass die Mengen an CTRP-3 in Adipozyten um ein Vielfaches mehr sind (siehe Abb. 30). Dabei wurden THP-1 Zellen mittels PMA in einen Makrophagen-ähnlichen Zustand differenziert. Die verwendeten primären humanen Monozyten wurden mit Hilfe von CD14-beads aus Vollblut gewonnen. Durch *in vitro*

Differenzierung konnten aus humanen Präadipozyten von gesunden Spendern reife Adipozyten gewonnen werden.

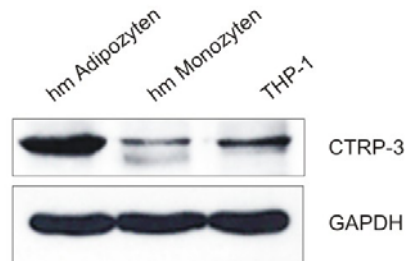


Abbildung 30: Vergleich der CTRP-3 Expression zwischen THP-1 Zellen, primären humanen Monozyten und *in vitro* differenzierten humanen Adipozyten. GAPDH diente als Beladungskontrolle.

3.2.1.2 Die Expression von CTRP-3 in humanen Monozyten von gesunden und diabetischen Spendern

Für Adiponektin ist bekannt, dass die Serumspiegel in Typ 2 Diabetikern und adipösen Patienten wesentlich geringer sind als in gesunden Kontrollpersonen. Somit gilt Adiponektin als das bisher einzige Adipokin, das sich invers zur Insulinsensitivität der Patienten verhält [58]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Monozyten aus gesunden und diabetischen Personen unterschiedliche Mengen an CTRP-3 bilden. Dies konnte bisher lediglich intrazellulär kontrolliert werden. Für genaue Analysen der CTRP-3 Freisetzung wäre ein etablierter spezifischer ELISA notwendig, der momentan noch nicht kommerziell erhältlich ist.

Die Zellen wurden aus dem Kollektiv an Kontrollpersonen (20 Probanden) und Typ 2 Diabetikern (30 Patienten) gewonnen, das im Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Dr. Margarita Bala (Klinik und Poliklinik der Inneren Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg) gesammelt wurde. Folgende Tabelle (Tab. 3) zeigt die Charakteristika des Kollektivs an.

In der Kontrollgruppe wurden die metabolischen Parameter nicht bestimmt. Aus den Citratseren, die durch die Blutentnahme mittels Vacutainer vorlagen, lassen sich die Werte nicht eindeutig bestimmen.

	Kontrollen (n=20)	Typ 2 Diabetes mellitus (n=30)
Frauen (n; %)	10 (50 %)	11 (36,7 %) n.s.
Männer (n; %)	10 (50 %)	19 (63,3 %) n.s.
BMI (kg/m ²)	21,9 ± 0,3	31,0 ± 2,3 * (p<0,01)
Alter (Jahre)	25,1 ± 1,5	62 ± 2,0 ° (p<0,01)
Lipoprotein-Metabolismus		
Cholesterin (mg/dl) [Bereich]	-	156 ± 5 [40-244]
Triglyzeride (mg/dl) [Bereich]	-	129 ± 6 [56-279]
HDL (mg/dl) [Bereich]	-	40 ± 1 [17-88]
LDL (mg/dl) [Bereich]	-	88 ± 3 [9-146]
Kohlenhydrat-Metabolismus		
HbA _{1c} (%) [Bereich]	-	7,5 ± 0,3 [4,6 – 18,0]
Nüchtern-Glukose (mg/dl) [Bereich]	-	157 ± 9 [81-500]
Entzündung		
CRP (mg/l)	-	29 ± 4
WBC (/nl)	-	8,0 ± 0,3
Anti-diabetische Behandlung		
Diät / Sport n (%)	-	3 (10 %)
Orale Behandlung n (%)	-	9 (30 %)
Insulin n (%)	-	14 (46,7 %)
Insulin + orale Behandlung n (%)	-	4 (13,3 %)

Tabelle 3: Charakteristika der Studien-Kohorte. * BMI der Kontrollgruppe vs. BMI der Typ 2 Diabetiker. ° Alter der Kontrollpersonen vs. Alter der Typ 2 Diabetiker. Mittelwerte ± SEM. Aus allen 50 Personen wurden erfolgreich Monozyten aus Vollblut isoliert.

Für die Western-Blot Untersuchungen wurde eine Auswahl der isolierten Monozyten verwendet (zehn Kontrollen vs. zehn Typ 2 Diabetiker).

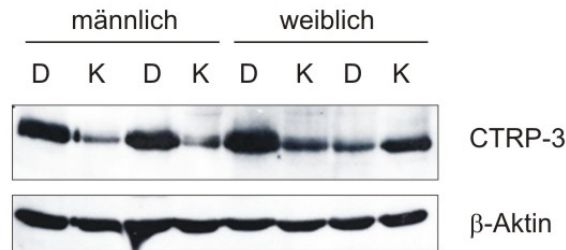


Abbildung 31: CTRP-3 Expression in humanen Monozyten von Kontrollen (K) und Typ 2 Diabetiker (D). β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

Die Expressions-Analyse mittels Western-Blot zeigte, dass CTRP-3 in gesunden und diabetischen Monozyten unterschiedlich stark exprimiert wird (siehe Abb. 31). So ließen sich in Monozyten von diabetischen Patienten tendenziell größere Mengen an intrazellulärem CTRP-3 detektieren.

3.2.2 Anti-inflammatorische Wirkung in humanen Monozyten

3.2.2.1 Anti-inflammatorische Wirkung in humanen Monozyten von gesunden Spendern

In früheren Untersuchungen ließ sich die anti-inflammatorische Fähigkeit von CTRP-3 an humanen Blutmonozyten bereits nachweisen [89]. Abbildung 31 zeigt Untersuchungen an weiteren Kontrollpersonen auf. Dabei bestätigten sich die Daten zu $\text{TNF}\alpha$ von Weigert *et al.* [89]. Zusätzlich zu $\text{TNF}\alpha$ lieferten die Analysen im Rahmen dieser Arbeit ähnliche Ergebnisse für IL-6. Dafür wurden isolierte Monozyten aus gesunden Spendern einer ÜN-Stimulation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS unterzogen. Eine Stunde vor Stimulation erfolgte die Zugabe von 1 $\mu\text{g/ml}$ CTRP-3. Im Zellüberstand ließen sich nach 18 h LPS-Inkubation erhöhte Zytokinkonzentrationen mittels ELISA nachweisen (IL-6 mit $p=0,002$ und $\text{TNF}\alpha$ mit $p=0,021$) (siehe Abb. 32). Die Kostimulation mit CTRP-3 übte auf die IL-6- und $\text{TNF}\alpha$ -Sekretion einen signifikant reduktiven Effekt aus ($p=0,035$ und $0,043$).

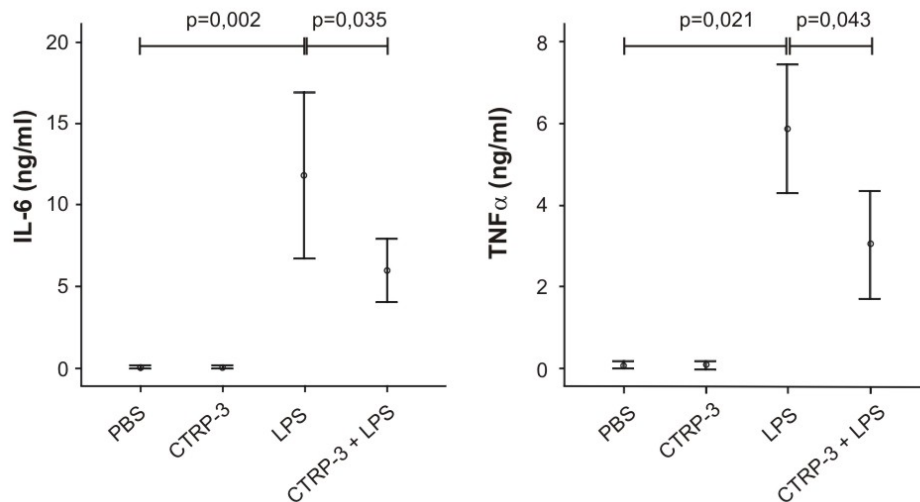


Abbildung 32: Stimulation von primären Monozyten aus 6 Kontrollpersonen mit 1 µg/ml LPS und 1 µg/ml CTRP-3. Im Zellüberstand wurden die Konzentrationen der Zytokine IL-6 und TNFα mittels ELISA bestimmt. n=6.

Bereits in den Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe war in THP-1 Zellen, die mit LPS behandelt und dabei einer 60-minütigen Vorbehandlung mit CTRP-3 unterzogen wurden, eine verringerte Translokation von NFκB p65 in den Zellkern im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen beobachtet worden [89].

Im Rahmen der Untersuchungen mit primären humanen Monozyten wurde am Beispiel zweier gesunder Spender das NFκB p65 Signaling untersucht, indem die Zellen für 60 min mit 1 µg/ml CTRP-3 vorstimuliert wurden. Daraufhin folgte eine 15-minütige Stimulation mit 1 µg/ml LPS. Nach Ernte der Zellen ließ sich die Phosphorylierung von NFκB p65 anhand Western-Blot überprüfen. Die LPS-Stimulation führte zu einer Induktion der NFκB Phosphorylierung, während die CTRP-3 Gabe auf diesen Effekt hemmend wirkte (siehe Abb. 33).

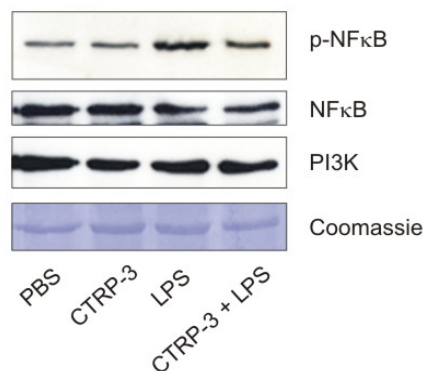


Abbildung 33: Western-Blot primärer humaner Monozyten. Die Zellen wurden 60 min mit 1 µg/ml CTRP-3 vorbehandelt und anschließend für 15 min mit 1 µg/ml LPS stimuliert. PI3K und Coomassie-Färbung diente als Beladungskontrolle.

Auch gesättigte Fettsäuren sind in der Lage, die Zelle pro-inflammatorisch zu aktivieren. Dazu erfolgten exemplarisch an Monozyten aus zwei gesunden Spendern (weiblich, 25-30 Jahre alt, BMI <25) Untersuchungen mit Laurinsäure.

Nach einer 60-minütigen Vorbehandlung mit 1 µg/ml CTRP-3 folgte eine 18-stündige Stimulation mit 200 µM Laurinsäure. Die Fettsäure-Gabe verursachte eine starke Induktion pro-inflammatorischer Parameter gemessen an IL-6 (Proband A: $p<0,001$; Proband B: $p=0,003$) und $\text{TNF}\alpha$ (Proband A: $p<0,001$; Proband B: $p=0,002$) im Zellüberstand. Zusätzliche Behandlung mit CTRP-3 wirkte sich signifikant hemmend auf die IL-6 (Proband A: $p<0,001$; Proband B: $p=0,003$) und $\text{TNF}\alpha$ Freisetzung aus (Proband A: $p<0,001$; Proband B: $p=0,008$) (siehe Abb. 34).

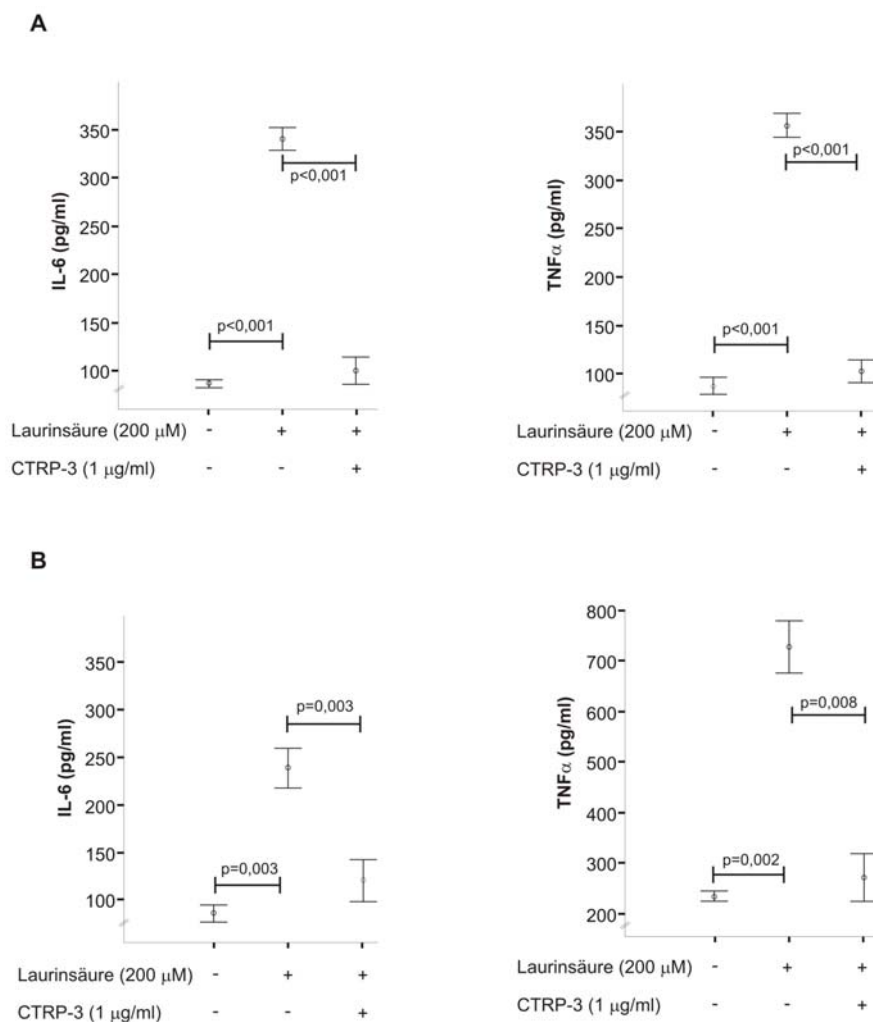


Abbildung 34: Der Effekt von CTRP-3 (1 µg/ml) auf die Laurinsäure-induzierte (200 µM) IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ Freisetzung in humanen Monozyten wurde mittels ELISA bestimmt. Die Graphen zeigen zwei exemplarische Experimente (Proband A und Proband B) an gesunden, jungen Probanden (n=4 Wells).

3.2.2.2 Anti-inflammatorische Rolle von CTRP-3 in Monozyten von gesunden Kontrollen vs. Typ 2 Diabetiker

Im Hinblick auf die Auswirkung einer Diabetes-Erkrankung und die Rolle von CTRP-3 im Rahmen dieser, wurden aus dem Kollektiv von 20 gesunden Kontrollpersonen und 30 Typ 2 Diabetikern, das im Verlauf der Arbeit aufgebaut worden war (siehe 3.2.1.2) von allen Probanden primäre Blutmonozyten isoliert und wie in den Vorversuchen mit LPS und CTRP-3 behandelt (siehe 3.2.2.1).

In den Zellüberständen wurden die Effekte von CTRP-3 auf die LPS-induzierte Freisetzung von MIF, MCP-1, CCL3/MIP1 α , CCL4 und CCL5 mittels ELISA analysiert (siehe Abb. 35 und 36).

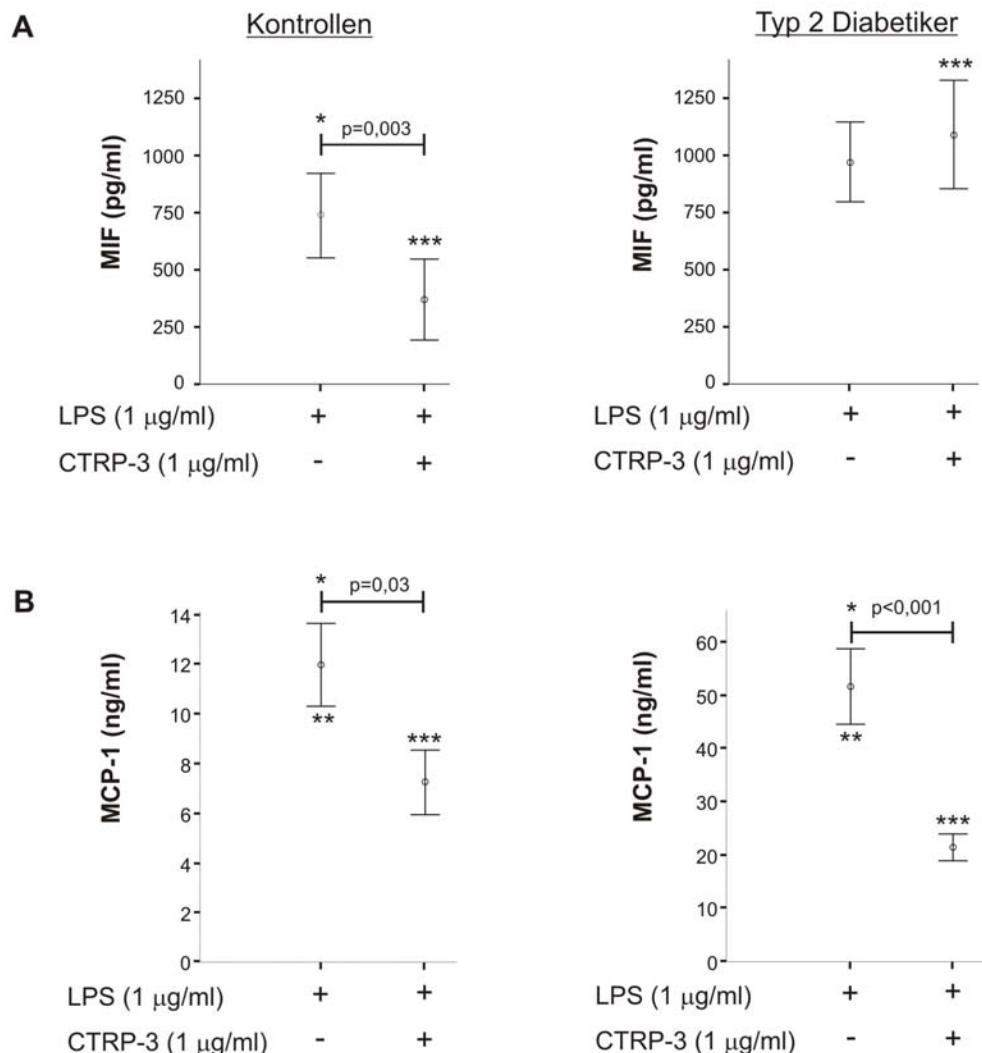


Abbildung 35: Primäre humane Blutmonozyten von gesunden Kontrollpersonen (links) und Typ 2 Diabetikern (rechts) wurden mit LPS (1 µg/ml) bzw. LPS und CTRP-3 (1 µg/ml) für 18 h stimuliert. Mittels ELISA erfolgte die Detektion von MIF (A) und MCP-1 (B). * Vergleich zwischen Stimulationsgruppen (LPS vs. LPS+CTRP-3); ** Vergleich der LPS Stimulation zwischen Kontrollen und Diabetikern; ***Vergleich der LPS+CTRP-3 Stimulation zwischen Kontrollen und Diabetikern.

Die LPS-induzierte MIF, CCL4 und CCL3 Sekretion war dabei in nicht-diabetischen Kontrollen und Typ 2 Diabetikern ohne signifikanten Unterschied.

Die LPS-induzierte MIF-Sekretion ließ sich in Kontrollen mittels CTRP-3 Gabe signifikant herabsetzen (* $p=0,003$). In Diabetikern war dieser Effekt nicht nachzuweisen. Die Kostimulation lieferte sogar signifikant höhere MIF-Mengen verglichen mit den Kontrollpersonen (** $p<0,001$).

MCP-1 konnte in beiden Gruppen durch die Kostimulation von LPS und CTRP-3 reduziert werden (Kontrollen (K): * $p=0,03$ und Diabetiker (D): * $p<0,001$). Insgesamt waren die MCP-1 Konzentrationen in der Diabetiker-Gruppe signifikant höher (** $p<0,001$; *** $p<0,001$).

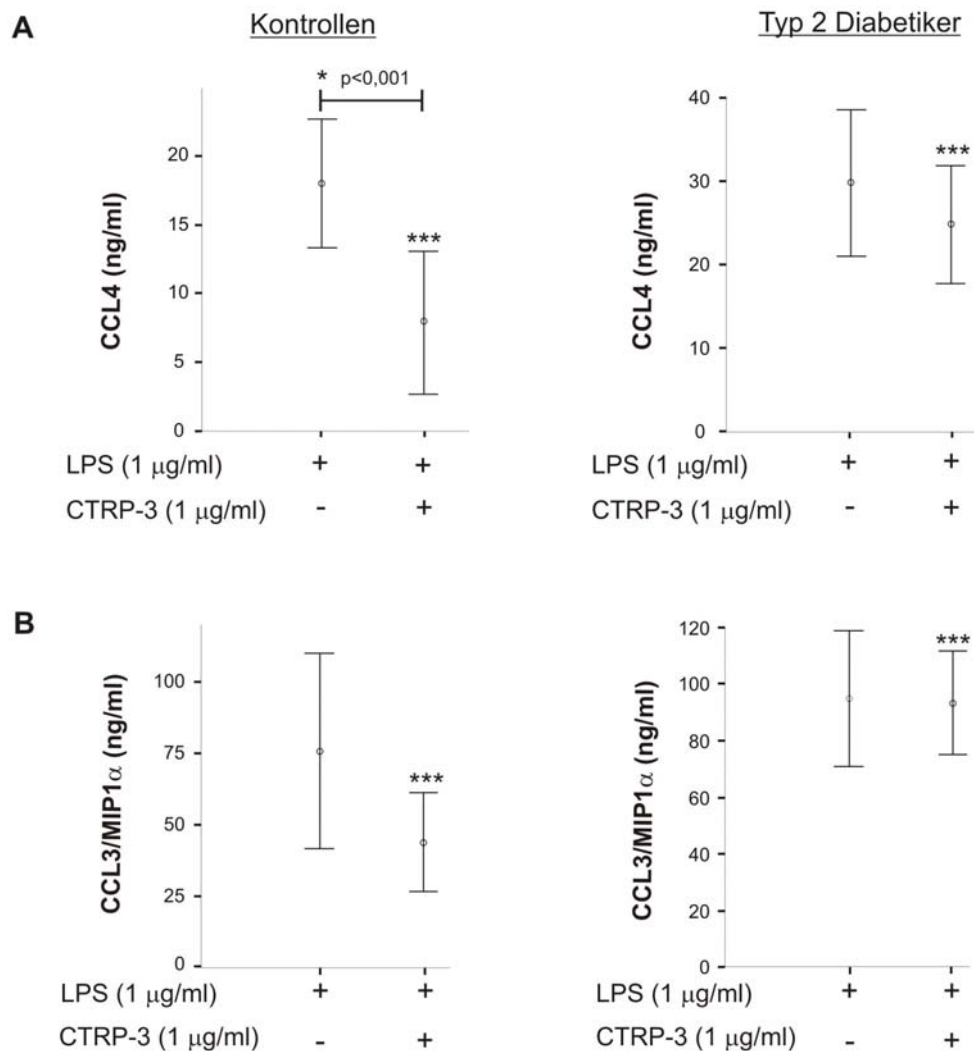


Abbildung 36: Primäre humane Blutmonozyten von gesunden Kontrollpersonen (links) und Typ 2 Diabetikern (rechts) wurden mit LPS (1 µg/ml) bzw. LPS und CTRP-3 (1 µg/ml) für 18 h stimuliert. Mittels ELISA erfolgte die Detektion von CCL4 (A) und CCL3/MIP1 α (B). * Vergleich zwischen Stimulationsgruppen (LPS vs. LPS+CTRP-3); ** Vergleich der LPS Stimulation zwischen Kontrollen und Diabetikern; ***Vergleich der LPS+CTRP-3 Stimulation zwischen Kontrollen und Diabetikern.

CCL4 wurde in Kontrollpersonen nach LPS-Gabe durch CTRP-3 reduziert (* $p < 0,001$). Dieser Effekt war in Diabetikern nicht mehr zu sehen, was sich verglichen mit Kontrollen in erhöhten CCL4 Konzentrationen äußerte (***) $p < 0,001$).

CTRP-3 konnte in Kontrollen und Diabetikern auf die CCL3 Freisetzung keinen Einfluss ausüben. Diabetiker wiesen aber in der Kostimulation signifikant höhere Konzentrationen auf (***) $p < 0,001$). Die CCL5 Level in Kontrollen und Diabetikern waren ohne Unterschied und CTRP-3 hatte keinen Effekt auf die Sekretion des Chemokins (Daten nicht gezeigt).

3.3 CTRP-3 in humanem Serum von Kontrollpersonen vs. Typ 2 Diabetiker

Das Vorhandensein eines Signalpeptids und seine hydrophile Beschaffenheit ließen bereits bei der Erstbeschreibung die Vermutung zu, dass es sich bei CTRP-3 um ein Protein handelt, das von der Zelle sezerniert wird.

Inzwischen konnte in murinem, aber auch in humanem Serum CTRP-3 mittels Western-Blot nachgewiesen werden [90-91]. Für exakte quantitative Aussagen wird in Zukunft ein etabliertes ELISA System erforderlich sein.

Die Mengen an CTRP-3 in humanem Serum zeigten sich im Rahmen eines Oralen Glukose-Toleranz-Tests (OGTT) unabhängig von der Glukose-Gabe in jungen, gesunden Probanden [90].

Um einen Hinweis auf Unterschiede in den zirkulierenden Mengen von CTRP-3 in gesunden Kontrollpersonen verglichen mit Patienten mit Typ 2 Diabetes zu bekommen, wurden Western-Blot Analysen durchgeführt. Hierbei zeigten sich im Serum von Probanden aus dem in 3.2.1.2 beschriebenen Kollektiv keine Unterschiede in der Expression von CTRP-3 zwischen Kontrollpersonen und Typ 2 Diabetikern. CTRP-3 wurde in den Proben als Trimer (90 kDa) und als HMW-Komplex (180-250 kDa) detektiert. Außerdem waren keine geschlechts- und BMI-spezifischen Unterschiede zu erkennen (siehe Abb. 37). In der Gruppe mit BMI > 25 zeugte sich auch kein geschlechtsspezifischer Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Probanden.

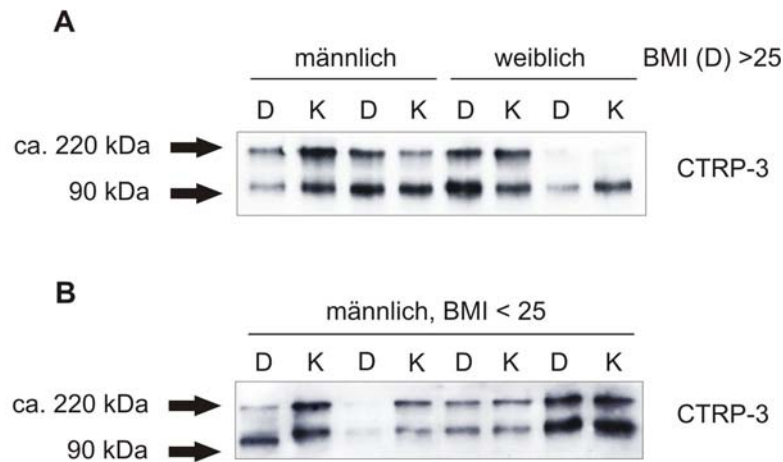


Abbildung 37: CTRP-3 Nachweis in humanem Serum. Eine Auswahl an Serumproben von Kontrollpersonen (K) und Diabetikern (D) wurden mit Hilfe von Western-Blot analysiert. Die Probanden wurden eingeteilt in BMI>25 (A) und BMI<25 (B). Außerdem wurden geschlechtsspezifische Gruppen gebildet.

3.4 CTRP-3 in Peritonealflüssigkeit von Patienten mit Aszites

Im Rahmen einer Studie der Inneren Medizin I (Universitätsklinikum Regensburg), die eine Kohorte aus 250 Patienten mit Aszites in der Zeit von Januar 2007 bis April 2008 zusammenstellte (unter der Leitung von PD Dr. Reiner Wiest und Prof. Dr. Andreas Schäffler), wurde in Patienten mit Aszites erstmals die Anwesenheit von Adipokinen in Peritonealflüssigkeit überprüft [100].

In 96 Patienten trafen die Studienkriterien zu und es wurde eine Parazentese (Punktion der Bauchhöhle und Aszites-Drainage) durchgeführt. Die nachfolgende Tabelle (Tab. 4) zeigt die Charakteristika der Kohorte auf.

Charakteristika der Studienkohorte	
Kohorte	n = 96 (100 %)
Männer n (%)	71 (18,4 %)
Frauen n (%)	25 (52,2 %)
BMI (kg/m ²) (Mittelwert \pm SEM)	26,1 \pm 0.8 (Bereich: 15,4 – 66,9)
Alter (Jahre) (Mittelwert \pm SEM)	58 \pm 1 (Bereich: 32 – 85)
Leberzirrhose	76 (79,2 %)
Keine Leberzirrhose	20 (20,8 %)
Leberzirrhose CHILD-Pugh A	2 (2,6 %)
Leberzirrhose CHILD-Pugh B	29 (38,2 %)
Leberzirrhose CHILD-Pugh C	45 (59,2 %)
Ursache der Leberzirrhose	
Alkohol	53 (55,2 %)
Chronische Hepatitis B/C	12 (12,5 %)
andere	11 (11,5 %)
Keine Zirrhose	20 (20,8 %)
Ursache des Aszites	
Portale Hypertonie	75 (78,1 %)
malign	9 (9,4 %)
kardial	5 (5,2 %)
Pankreas bedingt	3 (3,1 %)
andere	4 (4,2 %)
Peritonitis	17 (17,7 %)
keine Peritonitis	79 (82,3 %)
Hepatozelluläres Karzinom	8 (8,3 %)
Kein hepatozelluläres Karzinom	88 (91,7 %)

Tabelle 4: Charakteristika der Studienkohorte von Patienten mit Aszites.

Mit den gewonnen Proben wurden Western-Blot Analysen für den Nachweis von CTRP-3 durchgeführt. Daraus ließ sich die Menge an CTRP-3 semiquantitativ abschätzen. Bei ca. 70 % der Patienten konnte eine schwache bis starke Expression detektiert werden. Lediglich bei 29,2 % der Patienten war kein CTRP-3 nachzuweisen. Tabelle 5 gibt die Auswertung der semiquantitativen Auswertung (OptiQuant[®] Analyzer Software) der CTRP-3 Expression der Kohorte wieder.

CTRP-3 Expression (Western-Blot)	keine	schwach	mäßig	stark
Ganze Kohorte (n=96)	28 (29,2 %)	36 (37,5 %)	21 (21,9 %)	11 (11,5 %)
männlich	17 (23,9 %)	29 (40,8 %)	16 (22,5 %)	9 (12,7 %)
weiblich	11 (44,0 %)	7 (28,0 %)	5 (20,0 %)	2 (8,0 %)
BMI < 25 kg/m ²	13 (35,1 %)	11 (29,7 %)	8 (21,6 %)	5 (13,5 %)
BMI ≥ 25 kg/m ²	15 (25,4 %)	25 (42,4 %)	13 (22,0 %)	6 (10,2 %)
Leberzirrhose	22 (28,9 %)	31 (40,8 %)	16 (21,1 %)	7 (9,2 %)
Keine Leberzirrhose	6 (30,0 %)	5 (25,0 %)	5 (25,0 %)	4 (20,0 %)
Leberzirrhose CHILD-Pugh B	8 (22,9 %)	9 (25,7 %)	8 (22,9 %)	4 (11,4 %)
Leberzirrhose CHILD-Pugh C	13 (21,7 %)	19 (31,7 %)	7 (11,7 %)	2 (3,3 %)
Peritonitis	5 (29,4 %)	4 (23,5 %)	4 (23,5 %)	4 (23,5 %)
keine Peritonitis	23 (29,1 %)	32 (40,5 %)	17 (21,5 %)	7 (8,9 %)

Tabelle 5: Auswertung der semiquantitativen Analyse der CTRP-3 Expression in Patienten mit Aszites.

In Abbildung 38 ist ein exemplarischer Western-Blot dargestellt, der eine Auswahl an Peritonealflüssigkeit-Proben von Patienten mit unterschiedlichen Mengen CTRP-3 im Vergleich zu rekombinantem CTRP-3 (Spur P) veranschaulicht. Die Spuren 6 und 7 zeigen Patienten ohne CTRP-3 Expression, Spur 1 bis 5 sind Beispiele mit schwacher, Spur 8 mit moderater und Spur 9 mit starker CTRP-3 Expression.

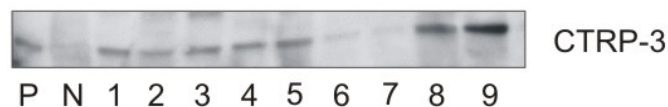


Abbildung 38: CTRP-3 in humaner Peritonealflüssigkeit in Patienten mit Aszites. Rekombinantes humanes CTRP-3 (1 µg) diente als Positivkontrolle (P). Die Spuren 1 bis 9 stehen jeweils für einen Patienten. N=Negativkontrolle (PBS).

Zur genaueren statistischen Analyse wurde das Patientenkollektiv in zwei Subgruppen eingeteilt: Gruppe 1 (negativ für CTRP-3) und Gruppe 2 (schwache, mäßige oder starke Expression von CTRP-3). Dabei ergab sich eine positive Korrelation der CTRP-3 Expression mit dem mittleren BMI der Patienten. Gruppe 1 hatte hierbei einen mittleren BMI von $23,9 \pm 1,5$ kg/m², während Patienten mit einer schwachen bis starken CTRP-3 Expression einen mittleren BMI von $26,8 \pm 0,9$ kg/m² aufwiesen ($p = 0,017$). Je höher der

BMI der Patienten, desto mehr CTRP-3 findet sich folglich in deren Peritonealflüssigkeit. Die lokale Expression von CTRP-3 in viszeralem Fettgewebe führt zu gesteigerter Sekretion von CTRP-3 in die Peritonealflüssigkeit bzw. Aszites.

3.5 CTRP-3 als LPS-Antagonist – Wechselwirkung mit TLR4

3.5.1 Der Einfluss von CTRP-3 auf die LPS-TLR4 Bindung

Die LPS-antagonisierende Rolle von CTRP-3 ließ sich in verschiedenen Zelltypen durch Messung pro-inflammatorischer Parameter deutlich aufzeigen (siehe 3.1.3 und 3.2.3). Welche Mechanismen hinter diesem Effekt stecken, ist unbekannt. Eine Down-Regulation des NF κ B-Signalings konnte in dieser Arbeit in Monozyten gezeigt werden.

Im Rahmen der Arbeit stand ein TLR4/MD-2 Fusionsmolekül zur Verfügung (bereitgestellt von Prof. Dr. Werner Falk und Dr. Philipp Gross, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg), das in der Lage ist, LPS zu binden und somit als gutes Modell für den LPS-Rezeptor TLR4 dient.

Mit Hilfe von ELISA-basierenden und Immunpräzipitation-basierenden Methoden (siehe 2.2.4.10) wurde überprüft, ob CTRP-3 die Bindung von LPS an seinen Rezeptor TLR4 beeinträchtigen kann.

Dazu wurde biotinyliertes LPS (bio-LPS) verwendet, das an das TLR4/MD-2 Fusionsmolekül bindet. Mittels Anti-FLAG-Antikörper wurden FLAG-getaggte TLR4/MD-2 Fusionsmoleküle an eine 96-Well Platte gebunden und mit bio-LPS inkubiert. Mittels Streptavidin-konjugierter HRP und TMB-Substrat konnte über die optische Dichte der Grad der Bindung von LPS an das Fusionsmolekül ermittelt werden. Wurde dem Ansatz ein 100-facher Überschuss an unmarkiertem LPS zugegeben, ließ sich bio-LPS verdrängen. Dieser Ansatz diente somit als Negativkontrolle bei den Experimenten.

Zur Untersuchung des Einflusses von CTRP-3 auf diese Ligand-Rezeptor-Bindung wurde der Ansatz neben bio-LPS mit zunehmenden Mengen CTRP-3 versetzt. Geringe Konzentrationen CTRP-3 (10 ng/ml und 100 ng/ml) hatten keinen inhibierenden Einfluss auf die LPS-TLR4 Bindung. Eine höhere Dosis CTRP-3 (1 μ g/ml und 10 μ g/ml) führte zu einer signifikanten Reduktion der optischen Dichte ($p=0,005$ und $p<0,001$) und inhibierte so die Bindung des Liganden LPS an das TLR4/MD-2 Fusionsmolekül (siehe Abb. 39).

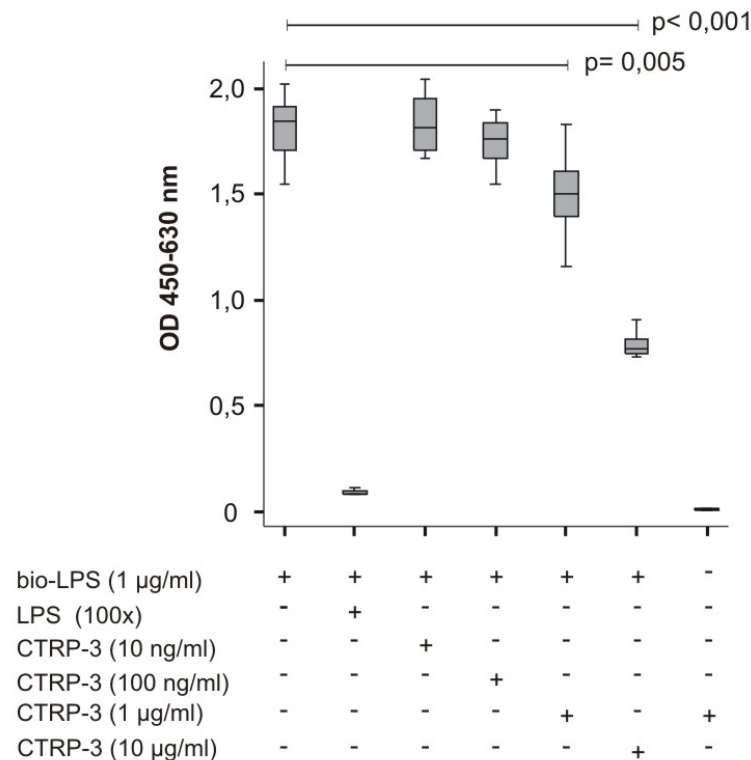


Abbildung 39: ELISA-basierende Methode zur Untersuchung des Einflusses von CTRP-3 auf die Bindung von bio-LPS an TLR4/MD-2 Fusionsmoleküle. Durch den Überschuss an LPS konnte das Signal stark abgeschwächt werden (Negativkontrolle, Spur 2). Zusätzlich wurden steigende Konzentrationen an CTRP-3 zum Ansatz gegeben (Spur 3 bis 6). Mittels photometrischer Messung wurde die OD bei 450 nm (abzüglich Referenzwert 630 nm) bestimmt.

Zur Verifizierung der oben beschriebenen Ergebnisse wurde eine Immunpräzipitation unter Verwendung von Streptavidin-konjugierter Sepharose als zusätzliche Methode durchgeführt. Dabei ließ sich zeigen, dass CTRP-3 die Bindung von bio-LPS an TLR4/MD-2 Moleküle abschwächt. Die über den Biotin-Rest gefällten Konstrukte wurden über Western-Blot mit Hilfe eines Anti-FLAG-Antikörpers, der den FLAG-Tag der TLR4/MD-2 Moleküle erkennt, detektiert. Spur 1 diente als Positivkontrolle und lieferte den Beweis der Bindung von bio-LPS an das Fusionsmolekül. Spur 2 und 3 stellten Negativkontrollen dar. Bei den Analysen zeigte eine schwächer werdende Bande in Spur 7, dass die Inkubation mit steigenden Mengen CTRP-3 in seiner höchsten Konzentration von 10 µg/ml die TLR4-LPS Bindung beeinträchtigen kann (siehe Abb. 40).

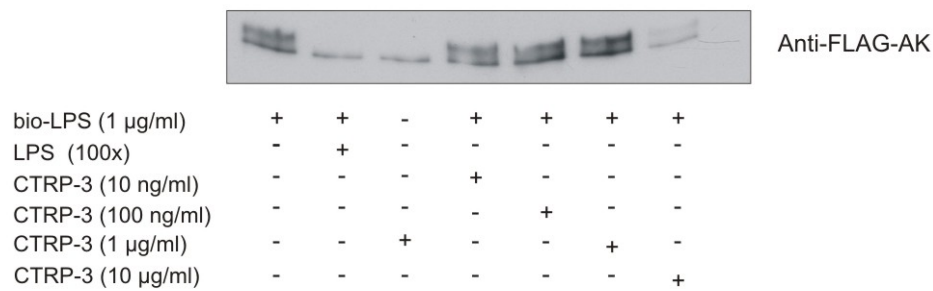


Abbildung 40: Western-Blot der Immunpräzipitation von biotinyliertem LPS mittels Streptavidin-konjugierter Sepharose. Über Anti-FLAG-Antikörper konnten die TLR4/MD-2 Moleküle (ca. 130 kDa) detektiert werden.

3.5.2 CTRP-3 und seine Interaktion mit LPS

Die Beeinträchtigung der Interaktion von LPS und TLR4 durch CTRP-3 kann durch unterschiedliche Mechanismen zustande kommen. Für Adiponektin wurde eine direkte Bindung an LPS bereits publiziert [118]. Durch eine direkte Bindung können möglicherweise höher molekularer Komplexe entstehen, die für eine sterische Inhibierung der LPS-TLR4 Interaktion sorgen. Die Bindung von CTRP-3 an LPS sollte im Rahmen der folgenden Untersuchungen ausgeschlossen werden.

Für die Experimente wurde nach empirischer Ermittlung der geeigneten Konzentration 10 µg/ml CTRP-3 an 96-Well ELISA-Platten gecoatet. Nach Blockierung mit PBS + 20 % FCS fand eine 2-stündige Inkubation mit ansteigenden Mengen bio-LPS statt. Der Nachweis einer Bindung ließ sich schließlich über Streptavidin-HRP und TMB-Substrat durch Farbumschlag detektieren. Dabei wurde kein Signal, also keine Bindung an LPS nachgewiesen (Abb. 41B). CTRP-3 dagegen wurde auf den Platten mittels anti-CTRP-3 Antikörper (Kaninchen) und sekundärem anti-Kaninchen-Antikörper detektiert (Abb. 41A).

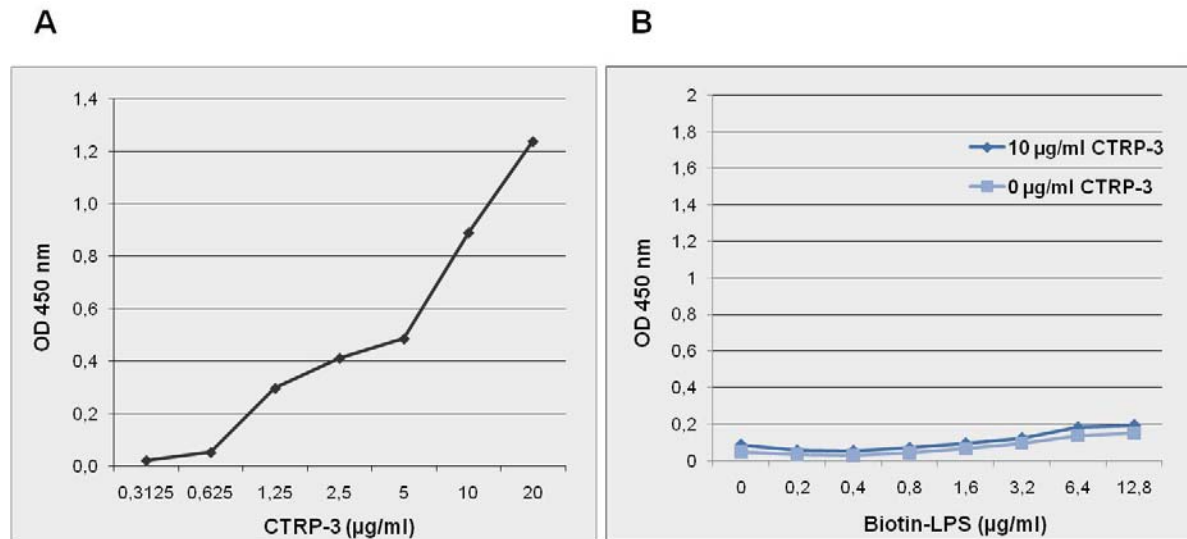


Abbildung 41: ELISA-basierende Analyse der Bindung von LPS an CTRP-3. CTRP-3 bindet an eine ELISA-Platte (A) und kann mittels CTRP-3 Antikörper nachgewiesen werden. B zeigt das Ergebnis einer Inkubation von steigenden Mengen bio-LPS auf einer CTRP-3 gecoateten Platte (10 µg/ml CTRP-3) im Vergleich zur ungecoateten Platte (0 µg/ml CTRP-3).

3.6 CTRP-3 *in vivo*: ein Maus-SIRS-Modell

Die Relevanz von CTRP-3 als anti-inflammatorisches Agens ließ sich an Zellkulturmodellen sowie primären humanen Zellen in Adipozyten und Monozyten deutlich nachweisen. Um seine Anwendung aber auch *in vivo* zu überprüfen, wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals Untersuchungen an einem Mausmodell für ein LPS-induziertes SIRS durchgeführt. Von Interesse war dabei die Wirkung im Verlauf einer akuten Infektion, die mittels LPS-Gabe simuliert wurde. C57BL/6 Wildtyp-Mäuse, die jeweils zwischen acht und zehn Wochen alt waren, wurden für die Experimente mit 1 und 10 µg LPS/Maus (in PBS) intraperitoneal gespritzt. Nach zwei Stunden wurden die Tiere getötet; Herzblut und epididymales Fettgewebe wurden asserviert. Die Funktionalität der Behandlung wurde anhand Messung inflammatorischer Parameter im Serum der Mäuse mittels ELISA bestimmt. Die Vorversuche zur empirischen Ermittlung der geeigneten LPS-Dosis machten deutlich, dass eine Dosis von 1 µg LPS/Maus geeignet und ausreichend ist für eine pro-inflammatorische Reaktion nach zwei Stunden (Daten nicht gezeigt).

Für die Hauptversuche fand eine Unterteilung der Mäuse in sechs Versuchsgruppen statt. Jede Gruppe bestand aus drei bis fünf Mäusen. CTRP-3 bzw. das Lösungsmittel PBS wurde den Tieren jeweils 30 min vor LPS- bzw. PBS-Gabe intraperitoneal (ip) verabreicht. CTRP-3 wurde in den Versuchen in den Konzentrationen 1 und 10 µg/Maus eingesetzt, was einer

Menge von ca. 0,05 und 0,5 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht entspricht. LPS bzw. PBS wurde nach Ablauf der 30 min ip gespritzt. Nach weiteren zwei Stunden wurden die Tiere getötet. Von dem gewonnenen Serum erfolgte eine Messung der Entzündungsparameter IL-6 und CXCL2/MIP-2 mittels ELISA. CXCL2/MIP-2 gilt als ein dem humanen IL-8 funktionell homologes Chemokin [119]. Hierbei ließ sich eine starke Induktion von IL-6 ($p=0,013$) und CXCL2/MIP-2 ($p=0,028$) der LPS-behandelten Tiere nachweisen. Eine zusätzliche Gabe von CTRP-3 führte im Serum der Mäuse zu einer deutlichen Minderung der pro-inflammatorischen Aktivität (siehe Abb. 42). Die Konzentration von IL-6 ließen sich von $21282,7 \pm 1125,3$ pg/ml auf $15137 \pm 1941,2$ pg/ml reduzieren ($p=0,043$). Die CXCL2/MIP-2 Sekretion senkte sich von $34333,9 \pm 5141,7$ pg/ml auf $18530,9 \pm 2617,8$ pg/ml ($p=0,043$).

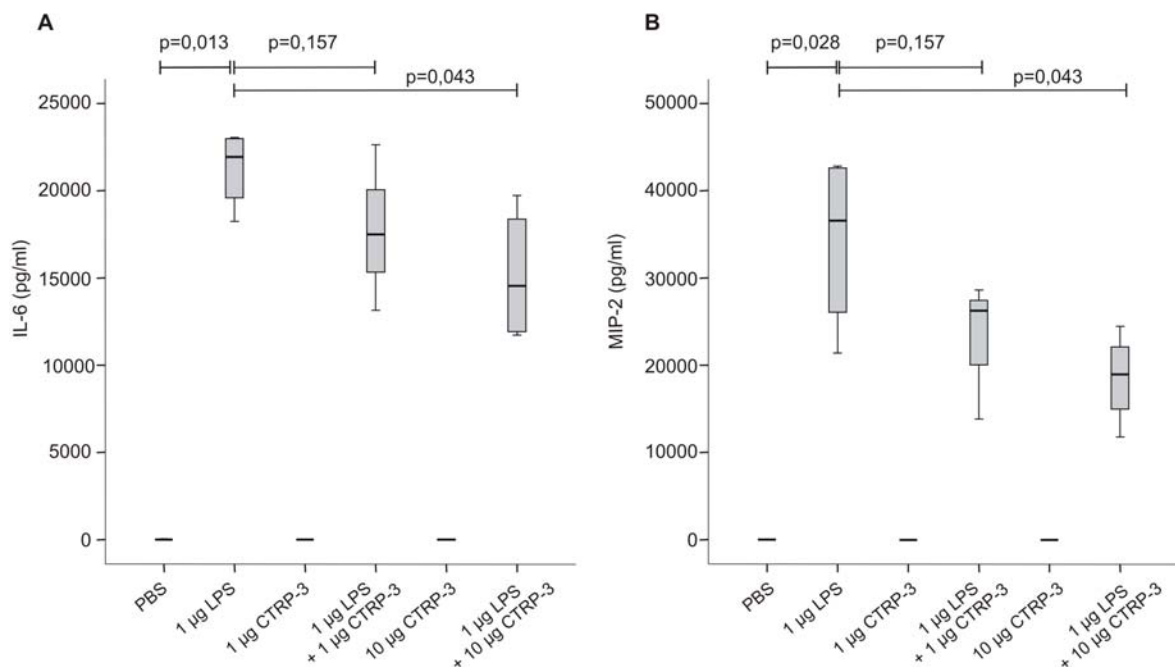


Abbildung 42: Analyse der IL-6 und CXCL2/MIP-2 Sekretion von 3-5 Mäusen unter Behandlung mit LPS bzw. LPS und 1 μg oder 10 μg CTRP-3 mittels ELISA.

Die Auswirkungen auf das Fettgewebe und dessen inflammatorischen Zustand wurde ermittelt, indem mRNA aus dem epididymalen Fett isoliert und mittels RT-PCR in cDNA überführt wurde. Diese diente zur Bestimmung der pro-inflammatorischen Parameter IL-6 und CXCL2/MIP-2 im Fett mittels Real-Time RT-PCR.

Die Ergebnisse, die im Serum deutlich wurden, ließen sich auf mRNA-Ebene im epididymalen Fettgewebe der Tiere auf ähnliche Weise bestätigen. Insgesamt wurden 3 unabhängige Versuche mit jeweils 3 bis 5 Tieren pro Gruppe durchgeführt. Abbildung 43

veranschaulicht exemplarische Ergebnisse von 3 Tieren pro Versuchsgruppe. Dabei zeigt sich, dass eine Dosis von 10 μg CTRP-3 pro Maus dazu führt, dass die LPS-induzierte mRNA Expression von IL-6 ($p=0,009$) und CXCL2/MIP-2 ($p=0,006$) im Fettgewebe signifikant absinkt ($p=0,013$ und $0,007$).

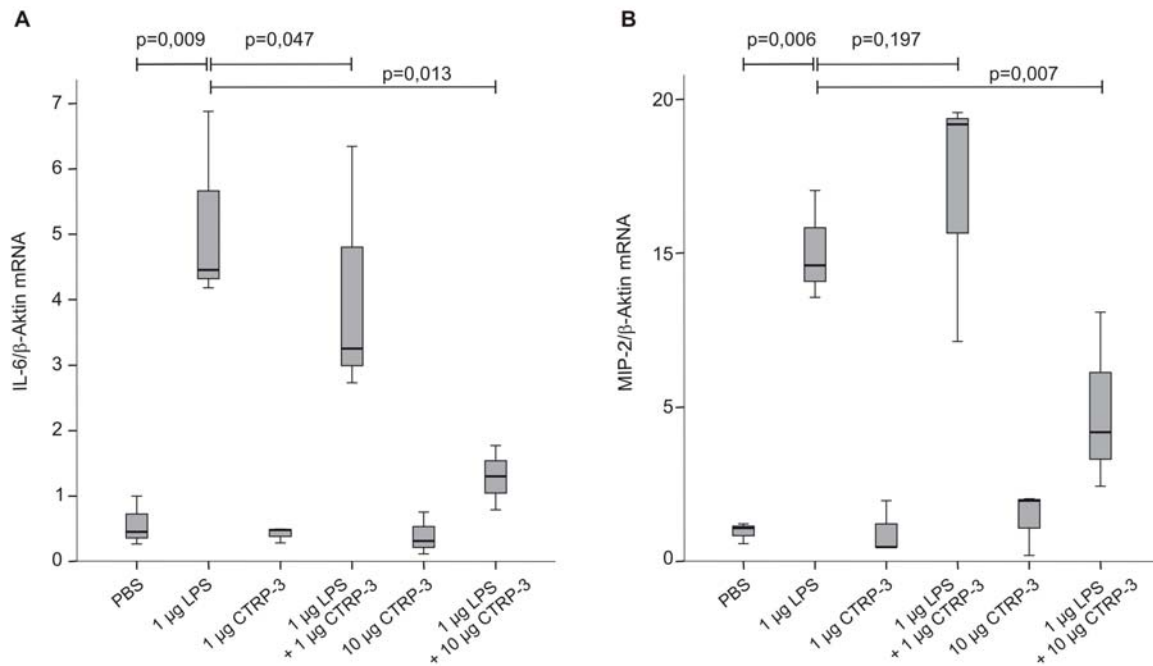


Abbildung 43: Analyse der mRNA Expression von IL-6 (A) und CXCL2/MIP-2 (B) in epididymalem Fettgewebe von Mäusen nach Behandlung mit LPS bzw. LPS und 1 μg oder 10 μg CTRP-3. Die Normalisierung gegen β -Aktin mRNA. Auswertung: Students's t-Test. $n=3$.

4 DISKUSSION

4.1 CTRP-3 als neuer Mediator eines Crosstalks zwischen Adipozyten und Monozyten

Das Fettgewebe ist ein endokrin und immunologisch hoch aktives Organ und agiert als ein Zusammenschluss einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen, die miteinander im Austausch stehen. Die Adipozyten sind in der Lage metabolische, aber auch immunmodulierende Funktion zu übernehmen [120] und dies sowohl endokrin als auch parakrin. Einhergehend mit der Adipositas werden Monozyten TLR4-abhängig in das Fettgewebe rekrutiert [26]; wie auch in anderen Krankheiten, die eine Infiltration von Makrophagen in das entzündliche Gewebe mit sich bringen (z.B. Atherosklerose) [121] scheint MCP-1 als chemotaktischer Wirkstoff beteiligt zu sein [27-28]; es wird sowohl von Adipozyten als auch Monozyten sezerniert [8]. Beide Zelltypen sind zur Bildung des bisher noch wenig untersuchten neuen Adipokins CTRP-3 fähig. Dessen Freisetzung in den Blutkreislauf lässt ebenso auf autokrine und parakrine, wie auch endokrine Eigenschaften schließen.

4.1.1 CTRP-3 - Expressionsmuster in Adipozyten

CTRP-3 wird in Adipozyten im Verlauf ihrer Differenzierung produziert. In 3T3-L1 Zellen ließ sich der Nachweis von CTRP-3 mRNA und Protein ab dem zweiten Tag der Differenzierung erbringen (Abb. 7). Die zunächst relativ schwache Expression wird erst in der späten Phase der Differenzierung stark induziert, weshalb CTRP-3 als ein später Marker der Adipozyten-Differenzierung eingeordnet werden kann. Vergleichbar mit Adiponektin nimmt seine Expression parallel mit ansteigender Expression von Markern der Adipozyten-Differenzierung zu [122-123].

Anhand einzelner humaner Spender war es möglich, CTRP-3 auch in humanen Adipozyten auf Proteinebene darzustellen. CTRP-3 scheint in höherem Maße in subkutanen als in viszeralen Fettgewebsdepots vorhanden zu sein. Einen Hinweis hierfür lieferte der Vergleich von Adipozyten aus subkutanem und viszeralem Fettgewebe aus unterschiedlichen Spendern. Auch für Adiponektin ist eine vermehrte Proteinexpression in subkutanem Fettgewebe beschrieben [124]. Dies liefert die Erklärung für die hohen

Adiponektin-Serumspiegel in nicht-diabetischen Personen. In viszeralem Fettgewebe werden dagegen geringe Adiponektin-Proteinmengen detektiert [125]. Welche Auswirkungen die Stärke der intrazellulären Proteinexpression von CTRP-3 in unterschiedlichen Fettgewebsdepots auf die Sekretion hat, kann erst mithilfe eines sensitiven kommerziellen ELISAs quantifiziert werden; dieser ist jedoch im Moment noch nicht erhältlich.

4.1.2 Adipogene Wirkung und Signaltransduktion in Adipozyten

Eine Behandlung reifer Adipozyten mit rekombinantem CTRP-3 führt zu einer Induktion der Adipokine-Freisetzung der Zellen, gezeigt am Beispiel von Resistin und Adiponektin (Abb. 13). In Stimulationsversuchen, bei denen die Adipozyten während ihrer Differenzierung zusätzlich mit CTRP-3 behandelt wurden, ließ sich außerdem eine zunehmende Triglyzerid-Einlagerung beobachten (Daten nicht gezeigt), sodass CTRP-3 möglicherweise eine Rolle als Adipogenese-förderndes Agens zugesprochen werden kann. Wurde den Adipozyten durch Knockdown CTRP-3 entzogen, verursachte dies dagegen eine herabgesetzte Freisetzung des anti-inflammatorischen und anti-diabetischen Adiponektin. Andere adipogene Wirkstoffe wie Insulin induzieren die Expression von Adipokinen. Ein Insulin-Entzug führt während der Differenzierung zu einer stark verminderten Expression von Adiponektin [122]. Die zusätzliche Insulin-Behandlung dagegen sorgte für eine induzierte CTRP-3 Expression in reifen Adipozyten (Abb. 29).

Rekombinantes CTRP-3 schaltet in Adipozyten unterschiedliche Signalwege an. Wie bereits für Endothelzellen [94] und vaskuläre glatte Muskelzellen [93] nachgewiesen, aktiviert CTRP-3 auch in Adipozyten die Kinasen ERK1/2 und p38 MAPK. Adiponektin induziert in Adipozyten die AMP-aktivierte Protein Kinase. Diese Aktivierung ist begleitet von einer Veränderung im zellulären Energiestatus. Das Verhältnis AMP/ATP steigt im Rahmen der Adiponektin-induzierten Aktivierung an [126]. Dieser Signalweg konnte für CTRP-3 in Adipozyten nicht bestätigt werden.

4.1.3 CTRP-3 als anti-inflammatorischer Wirkstoff in Monozyten und Adipozyten

An der monozytären Zelllinie THP-1 und an humanen Monozyten war der anti-inflammatorische Effekt von CTRP-3 nach pro-inflammatorischer Aktivierung mittels bakteriellem LPS bereits gezeigt worden [89]. In dieser Arbeit ließ sich diese Wirkung in weiteren gesunden Probanden bestätigen: CTRP-3 war in der Lage, die LPS-induzierte IL-6 und TNF α Sekretion von humanen Monozyten zu inhibieren.

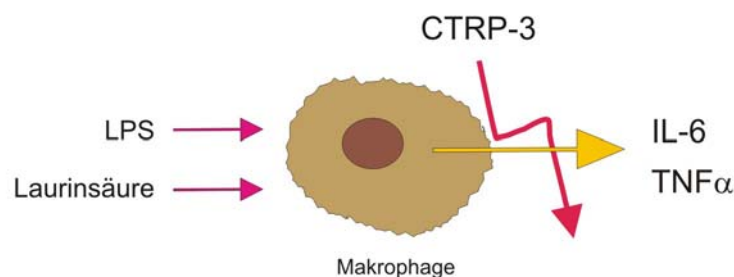


Abbildung 44: Schematische Darstellung der Effekte von CTRP-3 auf die LPS- und Laurinsäure-induzierten Mechanismen in Monozyten/Makrophagen.

Dabei konnte eine verminderte NF κ B Phosphorylierung nach Kostimulation mit CTRP-3 beobachtet werden. Für Adiponektin und seine anti-inflammatorische Rolle in Makrophagen ist ebenso eine verminderte NF κ B Translokation in den Zellkern nachgewiesen [127].

Zusätzlich ließ sich der entzündungsfördernde Effekt der gesättigten Fettsäure Laurinsäure durch CTRP-3 Behandlung antagonisieren. CTRP-3, dessen Hauptquelle die Adipozyten darstellen, scheint folglich endokrine, aber auch parakrine Wirkung auf Monozyten auszuüben.

Die autokrine Wirkung eines Agens, die es auf die produzierende Zelle selbst ausübt, konnte an 3T3-L1 Adipozyten und humanen Adipozyten nachgewiesen werden. LPS, Fettsäuren und alternative TLR-Liganden repräsentieren drei basale und weit verbreitete metabolische und inflammatorische Signalmoleküle, die den Crosstalk zwischen Adipozyten und Fettgewebs-Makrophagen vermitteln [128]. An der adipozytären Zelllinie 3T3-L1 und an humanen Adipozyten ließ sich veranschaulichen, dass der inflammatorische Effekt dieser drei Signalmoleküle durch Vorbehandlung mit CTRP-3 signifikant antagonisiert werden kann.

CTRP-3 hemmt die Zytokin/Chemokin-Sekretion		
proinflammatorischer Stimulus	in Monozyten	in Adipozyten
LPS	IL-6 TNF α MCP-1 MIF CCL3 CCL4	MCP-1
Laurinsäure	IL-6 TNF α	MCP-1
Pam3Cys		MCP-1
Poly (I:C)		MCP-1

Tabelle 6: Zusammenfassung der von CTRP-3 beeinflussten Zytokin/Chemokin-Sekretion in Monozyten und Adipozyten.

4.2 TLR4 als Schaltstelle für die Wirkung von CTRP-3

Die Aktivierung von TLR4 durch LPS und Fettsäuren - Moleküle, die eine Insulinresistenz und Entzündung hervorrufen - wird als molekularer Link zwischen Metabolismus und Immunsystem betrachtet [36, 120]. Eine Stimulation von Adipozyten mit LPS führt nicht nur zu einer pro-inflammatorischen Aktivierung, sondern generiert auch insulinresistente Adipozyten [132]. Diese Daten untermauern die Hypothese, dass TLR4, aktiviert durch LPS oder Fettsäuren, eine Schaltstelle zwischen Inflammation bzw. Infektion und dem Metabolismus des ganzen Körpers bzw. des Insulin-Signalings repräsentiert.

In dieser Arbeit ließ sich erstmals demonstrieren, dass CTRP-3 als effektiver, negativer Regulator einer TLR4 vermittelten Immunantwort in Adipozyten und Monozyten charakterisiert werden kann. Spezifisch und dosisabhängig war es möglich, die Bindung von LPS an seinen Rezeptor TLR4 - repräsentiert durch ein TLR4/MD-2 Fusionsmolekül - zu beeinflussen. Grundsätzlich sind verschiedene Mechanismen möglich, die die verringerte Bindungsaffinität verursachen können. Vorstellbar wäre zum einen eine Interaktion von

CTRP-3 mit dem Fettsäure-Anteil im Lipid A von LPS. Eine inhibierende Wirkung von CTRP-3 auf die Effekte der Laurinsäure - eine häufig in LPS vorhandene Fettsäure - wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits nachgewiesen. Eine direkte Bindung von CTRP-3 an LPS, wie sie für Adiponektin beschrieben wurde [118], konnte nicht beobachtet werden.

Abbildung 46 fasst die Funktion von CTRP-3 im Crosstalk zwischen Adipozyten und Monozyten im Hinblick auf seinen Einfluss auf das TLR4 Signaling zusammen.

Dabei könnte CTRP-3 Einfluss auf die TLR4 vermittelte Induktion pro-inflammatorischer Zytokine in Adipozyten ausüben, die wiederum die Aktivierung und Rekrutierung von Makrophagen induzieren.

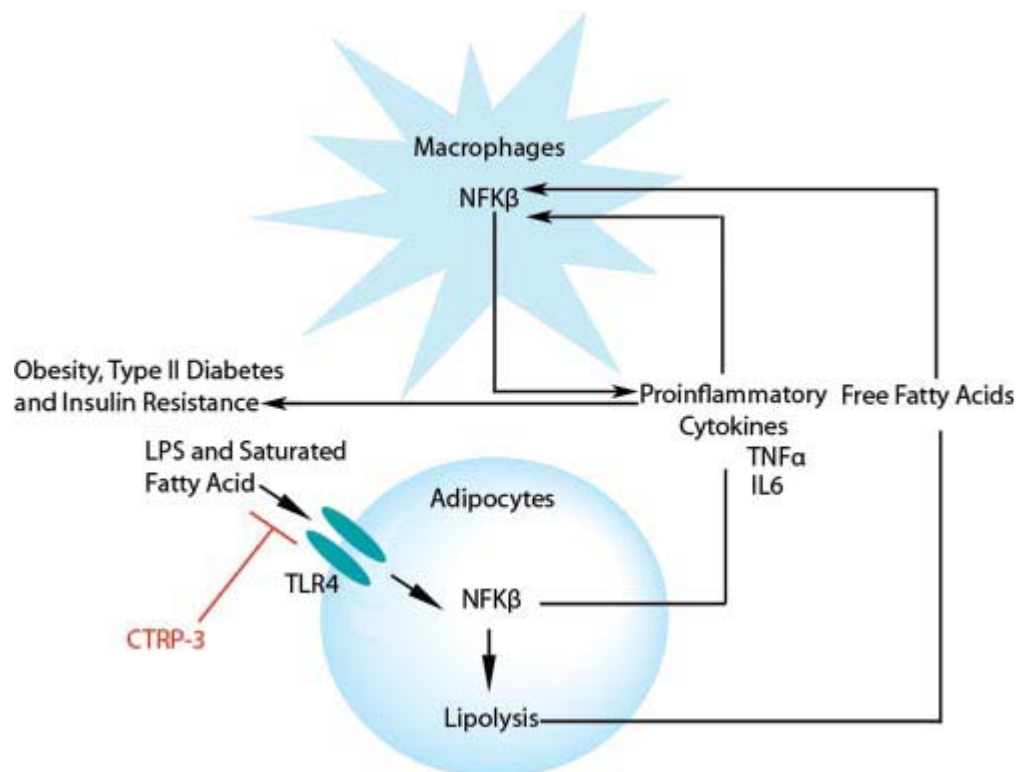


Abbildung 46: Veranschaulichung des Einflusses von CTRP-3 auf die Signaltransduktion von TLR4 und den dabei vorhandenen Crosstalk zwischen Monozyten/Makrophagen und Adipozyten [133].

4.3 CTRP-3 und sein Zusammenhang mit T2DM, Adipositas und Entzündung

4.3.1 CTRP-3 Expression in Abhängigkeit von BMI und T2DM

Die Adiponektin-Serumspiegel korrelieren negativ mit dem Auftreten einer Adipositas und eines Typ 2 Diabetes [134]. Erst die Entwicklung eines CTRP-3 ELISAs kann einen quantitativen Hinweis darauf geben, wie sich zirkulierendes CTRP-3 in diesen Krankheitsbildern verhält. In humanen Monozyten aus Diabetikern finden sich tendenziell erhöhte Mengen CTRP-3 (Abb. 31). Ob dies gleichermaßen zu erhöhten Serumkonzentrationen führt oder ebendies bedeutet, dass die Sekretion folglich reduziert ist und somit eine weitere Parallele zu Adiponektin aufgedeckt werden kann, müssen zukünftige Messungen zeigen. Die mittels Western-Blot abgeschätzten Serumspiegel von CTRP-3 konnten keinen Unterschied zwischen Kontrollpersonen und Patienten mit Typ 2 Diabetes veranschaulichen.

In Adipozyten kann eine Abhängigkeit der CTRP-3 Expression vom BMI beobachtet werden. Mit steigendem BMI nimmt das Expressionsniveau von CTRP-3 in subkutanen Zellen zu. Diese Beobachtung verhält sich analog zu den Ergebnissen in Monozyten. Die intrazellulären CTRP-3 Mengen sind in diabetischen Patienten erhöht. Der mittlere BMI dieser Gruppe lag bei 31,0. Viszerale Adipozyten dagegen verhielten sich bezüglich CTRP-3 Expression unabhängig vom BMI, jedoch tendenziell abhängig vom Krankheitsbild des Typ 2 Diabetes. Adipozyten aus einem diabetischen Spender zeigten leicht erhöhte CTRP-3 Proteinexpression.

Die Einblicke in die differenzielle Expression von CTRP-3, die diese Arbeit mithilfe der Proteinextrakte aus humanen Adipozyten gegeben hat, müssen durch die Überprüfung weiterer Spender noch verifiziert werden.

Eine positive Korrelation der CTRP-3 Expression mit dem BMI ließ sich weiterhin in Patienten mit Aszites bestätigen. Die in deren Peritonealflüssigkeit detektierten CTRP-3 Konzentrationen waren höher in Patienten mit einem BMI über 25.

4.3.2 Unterschiede in der Wirkung von CTRP-3 zwischen Kontrollpersonen und Typ 2 Diabetikern

Das Kollektiv aus 20 Kontrollpersonen und 30 Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus zeigt Unterschiede in der Effektivität von CTRP-3 in Abhängigkeit des Krankheitsbildes. Die anti-inflammatorische Wirkung von CTRP-3 war im Rahmen der Krankheit in der Mehrzahl der gemessenen Parameter verloren gegangen. Vorstellbar wäre, dass der chronische Entzündungszustand im Rahmen des Typ 2 Diabetes mit der eingesetzten Dosis an CTRP-3 nicht mehr behandelbar ist. Am Beispiel von MCP-1 wird deutlich, dass in der Gruppe der Diabetiker bereits durch LPS-Induktion signifikant höhere Konzentrationen an pro-inflammatorischen Parametern detektiert werden.

4.3.3 CTRP-3 Down-Regulation in der Entzündung

Eine leichte chronische Entzündung, die mit der Adipositas einhergeht, lässt sich durch die kontinuierliche Behandlung von Adipozyten mit LPS simulieren. Begleiterscheinung dabei war eine Down-Regulation der CTRP-3 Expression. Die chronische Entzündung im Verlauf der Adipozyten-Differenzierung verursachte in den Zellen eine pro-inflammatorische Aktivierung, die sich in gesteigerter MCP-1 Freisetzung und reduzierter Adiponektin-Sekretion verifizieren ließ. Daneben wirkte sich die Behandlung kontraproduktiv auf Triglyzerid-Einlagerung und somit vermutlich auf die Differenzierung der Adipozyten aus. Auch durch andere pro-inflammatorische Stimuli konnte bereits eine Beeinträchtigung der Adipogenese nachgewiesen werden. Neue Daten zu Interleukin-17, einem pro-inflammatorischen Zytokin, zeigen, dass die Behandlung der Adipozyten während ihrer Differenzierung zu verminderter Lipid-Einlagerung, aber auch zur Suppression Adipozyten-assoziiierter Gene wie Adiponektin, HSL, ATGL und FABP4 führt [135]. Ebenso verursachen Stimuli wie IL-6, TNF α und Interferon- γ eine verminderte Differenzierung von Adipozyten [136-137].

Verkleinerte Lipidtröpfchen und reduzierte intrazelluläre Triglyzerid-Konzentrationen bestätigten die mikroskopischen Beobachtungen. Eine eingeschränkte Differenzierung könnte dabei die Ursache für die reduzierte CTRP-3 Proteinexpression darstellen. Dies konnte durch die verringerten Expressionsniveaus einiger Adipozyten-spezifischer Proteine bestätigt werden. So ließen sich ATGL und HSL in reduziertem Maße nachweisen. Der

undifferenzierte Zustand der Zellen dürfte auch der Grund für die verminderte Lipolyserate der Zellen sein. Erst im ausgereiften Adipozyten findet das höchste Maß an Lipolyse statt.

Der Knockdown von CTRP-3 in Adipozyten hatte ähnliche Auswirkungen auf die Morphologie der Zellen. Der reduzierte intrazelluläre Triglyzerid-Gehalt und die verkleinerten Lipidtröpfchen sind Zeichen für eine De-Differenzierung zurück zum unreifen Adipozyt. Dieser Phänotyp ist charakterisiert durch die vermehrte Freisetzung pro-inflammatorischer Parameter (MCP-1) und verursacht außerdem eine verringerte Sekretion des anti-inflammatorischen, insulin-sensitivierenden Adiponektin.

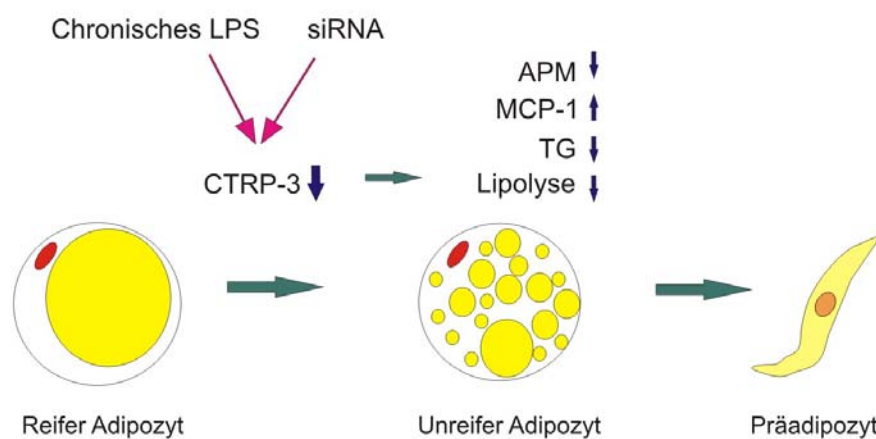


Abbildung 47: Schematische Darstellung der Effekte des CTRP-3 Knockdown und der LPS-induzierten CTRP-3 Down-Regulation auf den adipozytären Phänotyp. (TG = Triglyzeride).

Die Daten argumentieren nicht nur für eine anti-inflammatorische Rolle von CTRP-3, sondern könnten auch Hinweis dafür sein, dass CTRP-3 eine insulin-sensitivierende und Differenzierungs-induzierende Funktion in Adipozyten übernimmt. Die bisherigen Untersuchungen konnten jedoch noch keine veränderte Insulin-Signaltransduktion am Beispiel des Akt-Signalings nachweisen. In weiteren Studien soll diese Hypothese überprüft werden.

Infektionsexperimente in Adipozyten mit lebenden Bakterien am Beispiel von *Staphylococcus aureus* deuteten in gleichem Maße auf eine verminderte Expression von CTRP-3 im Rahmen einer Entzündung hin. Die genaue Klärung von Ursache und Konsequenz in diesem Zusammenhang muss durch weitere Untersuchungen analysiert werden.

Im Hinblick auf Krankheiten, die mit einer Infektion des Fettgewebes einhergehen oder aber eine bakterielle Translokation aus dem Darm mit sich bringen, könnten CTRP-3 und LPS den entstandenen Daten zufolge als physiologische Gegenspieler agieren. Ein anschauliches Beispiel dafür ist Morbus Crohn, eine chronisch entzündliche Darmerkrankung, bei der ein phänotypisches Merkmal das *Creeping Fat* darstellt, d.h. das mesenteriale Fettgewebe hypertrophiert und umzieht die entzündeten Darmabschnitte [123]. Es verursacht eine aktive Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren wie IL-6, TNF und MCP-1. Zusätzliche Barrierestörungen führen zu einer verstärkten Inflammation durch bakterielle Translokation; bakterielle Bestandteile (wie LPS) induzieren dabei die mucosale Zytokin-Produktion [138]. Die differenzielle Expression von CTRP-3 im Rahmen dieses Krankheitsbildes bzw. eine ektopische Behandlung mit CTRP-3 stellen neue interessante Forschungsgebiete dar. Die Sekretion von CTRP-3 aus viszeralem Fettgewebe-Explantaten aus Morbus Crohn-Patienten konnte bereits nachgewiesen werden (Daten unveröffentlicht).

4.4 CTRP-3 und seine Anwendung *in vivo*

In dieser Arbeit wurde erstmals im Mausmodell die anti-inflammatorische Fähigkeit von CTRP-3 *in vivo* überprüft. In C57BL/6 Wildtyp-Mäusen fand die Induktion eines SIRS-ähnlichen Zustandes durch LPS Injektion statt.

Durch eine 30-minütige Vorbehandlung mit CTRP-3 war es möglich, die durch LPS verursachte Induktion der IL-6 und CXCL2/MIP-2 Serumkonzentration abzuschwächen. Die Wirkung der prophylaktischen CTRP-3 Behandlung war sowohl im Serum als auch im epididymalen Fettgewebe (mRNA) nachweisbar.

Zur weiteren Analyse der anti-inflammatorischen Effektivität sind zukünftig Experimente mit lebenden Bakterien in Planung. Sollte CTRP-3 auch hier seine entzündungshemmenden Fähigkeiten unter Beweis stellen können, so stellt CTRP-3 ein vielversprechendes *drug target* zur Behandlung von Krankheiten, die mit einer Entzündung einhergehen, wie dem Metabolischen Syndrom, dar.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Durch die zelluläre Variabilität im Fettgewebe tritt eine Kopplung von Metabolismus und Immunsystem auf, die es ermöglicht, einen effizienten Crosstalk zwischen beiden physiologischen Systemen stattfinden zu lassen. Adipozyten exprimieren neben metabolisch aktiven auch immunmodulierende Substanzen, sowie die entsprechenden Rezeptoren.

CTRP-3 ist ein neues Adipokin, das nicht ausschließlich, jedoch in großem Maße von Adipozyten gebildet und sezerniert wird. Seine bisher beschriebenen Eigenschaften als Wachstumsfaktor, aber auch Regulator der hepatischen Glukose-Freisetzung lassen auf ein breites Funktionsspektrum von CTRP-3 schließen.

CTRP-3 ist abhängig vom BMI und vom Fettgewebsdepot in Monozyten und Adipozyten differenziell exprimiert. Ein hoher BMI scheint mit einer hohen Proteinexpression an CTRP-3 verbunden zu sein. Dies ließ sich an humanen Monozyten, humanen Adipozyten aus subkutanem Fett, aber auch in Peritonealflüssigkeit von Patienten mit Aszites unter Beweis stellen.

CTRP-3 besitzt anti-inflammatorische Fähigkeiten, die in dieser Arbeit sowohl an humanen Monozyten als auch an murinen und humanen Adipozyten aufgezeigt werden konnten.

Eine Verminderung der NFκB-Aktivierung, aber vor allem die Blockade der TLR4-vermittelten LPS-Wirkung stellt eines der Hauptergebnisse dieser Arbeit dar.

CTRP-3 ist ein vielversprechendes Agens, das als neues *drug target* im Rahmen von septischen Erkrankungen und in Krankheiten, die von chronischen Entzündungen begleitet werden, eine Bedeutung finden könnte. Ausschlaggebend für diese Hypothese sind die in dieser Arbeit erstmals durchgeführten Untersuchungen seiner immunmodulierenden Eigenschaften *in vivo*. Während der Induktion eines SIRS-ähnlichen Zustandes im Mausmodell lieferte CTRP-3 den Beweis für seine spezifische Effektivität bei einer sterilen, systemischen Entzündung, was sich durch Senken pro-inflammatorischer Serum-Parameter nachweisen ließ. Diese Daten sind das zweite wichtige Ergebnis dieser Arbeit.

Geplante Untersuchungen mit lebenden, gram-negativen Bakterien, die LPS als Endotoxin freisetzen, werden in Zukunft die bisherigen Hinweise auf die anti-inflammatorische *in vivo* Wirkung von CTRP-3 verifizieren müssen.

6 PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE

6.1 Publikationen

6.1.1 Erstautorenschaften

Kopp A, Bala M, Buechler C, Falk W, Gross P, Neumeier M, Schölmerich J, Schäffler A: C1q/TNF related protein-3 represents a novel and endogenous lipopolysaccharide antagonist of the adipose tissue. *Endocrinology* 2010; 151(11):5267-78.

Kopp A, Buechler C, Bala M, Neumeier M, Schölmerich J, Schäffler A: Toll-like receptor ligands cause proinflammatory and prodiabetic activation of adipocytes via phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase but not interferon regulatory factor-3. *Endocrinology* 2010; 151(3):1097-108.

Kopp A, Bala M, Weigert J, Buechler C, Neumeier M, Aslanidis C, Schölmerich J, Schäffler A: Effects of the new adiponectin paralogous protein CTRP-3 and of LPS on cytokine release from monocytes of patients with type 2 diabetes mellitus. *Cytokine* 2010; 49(1):51-57

Kopp A, Gross P, Falk W, Bala M, Weigert J, Buechler C, Neumeier M, Schölmerich J, Schäffler A: Fatty acids as metabolic mediators in innate immunity. *Eur J Clin Invest* 2009; 39(10):924-33.

Kopp A, Buechler C, Neumeier M, Weigert J, Aslanidis C, Schölmerich J, Schäffler A: Innate immunity and adipocyte function: ligand-specific activation of multiple Toll-like receptors modulates cytokine, adipokine, and chemokine secretion in adipocytes. *Obesity* 2009; 17(4):648-56.

6.1.2 Koautorenschaften

Hofmann C, Chen N, Obermeier F, Paul G, Buechler C, **Kopp A**, Falk W, Schäffler A: C1q/TNF-related Protein-3 (CTRP-3) is secreted by visceral adipose tissue and exerts anti-inflammatory and anti-fibrotic effects in primary human colonic fibroblasts. *Inflamm Bowel Dis* 2011. [in press]

Schäffler A, Hamer O, Dickopf J, Goetz A, Landfried K, Voelk M, Herfarth H, **Kopp A**, Büchler C, Schölmerich J, Brännler T: Admission Visfatin Levels Predict Pancreatic and Peripancreatic Necrosis in Acute Pancreatitis and Correlate With Clinical Severity. *Am J Gastroenterol* 2011, Jan 18. [Epub ahead of print]

Schäffler A, Hamer O, Dickopf J, Goetz A, Landfried K, Voelk M, Herfarth H, **Kopp A**, Büchler C, Schölmerich J, Brännler T: Admission resistin levels predict peripancreatic necrosis and clinical severity in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2010;105(11):2474-84

Bala M, **Kopp A**, Wurm S, Büchler C, Schölmerich J, Schäffler A: Type 2 Diabetes and Lipoprotein Metabolism Affect LPS-Induced Cytokine and Chemokine Release in Primary Human Monocytes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2010 Nov 22. [Epub ahead of print]

Bauer S, Wanninger J, Neumeier M, Wurm S, Weigert J, **Kopp A**, Bala M, Schäffler A, Aslanidis C, Buechler C: Elevated free fatty acids and impaired adiponectin bioactivity contribute to reduced SOD2 protein in monocytes of type 2 diabetes patients. *Exp Mol Pathol.* 2011 Feb;90(1):101-6. [Epub 2010 Oct 28]

Wiest R, Moleda L, Farkas S, Scherer M, **Kopp A**, Wönckhaus U, Büchler C, Schölmerich J, Schäffler A: Splanchnic concentrations and postprandial release of visceral adipokines. *Metabolism* 2010;59(5):664-70

Weber M, Sporrer D, Weigert J, Wanninger J, Neumeier M, Wurm S, Stögbauer F, **Kopp A**, Bala M, Schäffler A, Buechler C: Adiponectin downregulates galectin-3

whose cellular form is elevated whereas its soluble form is reduced in type 2 diabetic monocytes. *FEBS Letters*, 2009;583(22):3718-24

Sporrer D, Weber M, Wanninger J, Weigert J, Neumeier M, Stögbauer F, Bala M, **Kopp A**, Schäffler A, Buechler C: Adiponectin downregulates CD163 whose cellular and soluble forms are elevated in obesity. *Eur J Clin Invest* 2009; 39(8):671-9.

Wiest R, Leidl F, **Kopp A**, Weigert J, Neumeier M, Buechler C, Schoelmerich J, Schäffler A: Peritoneal fluid adipokines: ready for prime time? *Eur J Clin Invest* 2009; 39(3):219-29.

Schaeffler A, Gross P, Buettner R, Bollheimer C, Buechler C, Neumeier M, **Kopp A**, Schoelmerich J, Falk W: Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology* 2009;126(2):233-45

Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Wurm S, **Kopp A**, Schober F, Filarsky M, Schäffler A, Zeitoun M, Aslanidis C, Buechler C: Reduced response to adiponectin and lower abundance of adiponectin receptor proteins in type 2 diabetic monocytes. *FEBS Lett* 2008;582(12):1777-82

Wehrwein G, Neumeier M, Schäffler A, **Kopp A**, Weigert J, Abke S, Schölmerich J, Buechler C: Lipopolysaccharide regulated protein expression is only partly impaired in monocytes from patients with type I diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2006; 27;5:5

6.2 Kongressbeiträge

6.2.1 Poster

Kopp A, Buechler C, Neumeier M, Weigert J, Aslanidis C, Schölmerich J und Schäffler A: Angeborene Immunität und Adipozyten-Funktion: Liganden-spezifische Aktivierung multipler Toll-like Rezeptoren moduliert die Zytokin-, Adipokin- und Chemokin-Sekretion in Adipozyten.

52. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Gießen, 04.03.-07.03.2009

Kopp A, Büchler C, Neumeier M, Weigert J, Aslanidis C, Schölmerich J und Schäffler A:
Angeborene Immunität und Adipozyten-Funktion: Liganden-spezifische Aktivierung
multipler Toll-like Rezeptoren moduliert die Zytokin-, Adipokin- und Chemokin-Sekretion
in Adipozyten.

115. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden, 18.04.-
22.04.2009

Kopp A, Büchler C, Neumeier M, Weigert J, Schölmerich J und Schäffler A:

A functional Toll-like receptor pathway in murine and human adipocytes modulates
cytokine, adipokine and chemokine release and is mediated by ERK1/2 in murine
adipocytes.

European Lipoprotein Club 32nd Annual Meeting, Tutzing, 07.09.-10.09.2009

Kopp A, Bala, M, Bauer, S, Wanninger, J, Neumeier M, Büchler, C, Schölmerich J und
Schäffler A:

Toll-like receptor ligands cause pro-inflammatory activation of adipocytes via
phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and c-jun N-terminal kinase but not
interferon regulatory factor-3.

53. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Leipzig, 03.03.-06.03.2010

Kopp A, Bala, M, Bauer, S, Wanninger, J, Neumeier M, Büchler, C, Schölmerich J und
Schäffler A:

Toll-like Rezeptor-Liganden verursachen eine pro-inflammatorische Aktivierung von
Adipozyten über Erk1/2 und JNK1/2.

116. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden, 10.04.-
14.04.2010

→ **Posterpreis**

6.2.2 Passive Teilnahme

10th European Congress of Endocrinology, Berlin, 03.05.-07.05.2008

Meeting Young Active Research, Herrsching, 02.10.-04.10.2009

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Charalampos Aslanidis für die Betreuung dieser Arbeit, seine Hilfsbereitschaft und die Erstellung des Erstgutachtens bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Andreas Schäffler für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine großartige Betreuung und Unterstützung, seine Hilfe und seinen guten Zuspruch während meiner Arbeit und das Erstellen des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Richard Warth bedanke ich mich für die Bereitschaft, den dritten Prüfer im Prüfungsausschuss zu übernehmen.

Bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Wirth, der mich bereits während der Diplomarbeit betreut hat, bedanke ich mich ganz herzlich dafür, dass er den Vorsitz des Prüfungsausschusses übernimmt.

Bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Schölmerich möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, an der Klinik für Innere Medizin I meine Arbeit durchzuführen.

Vielen Dank auch an Frau PD Dr. Christa Büchler. Durch das tolle Praktikum während meines Studiums ist der Kontakt zur Arbeitsgruppe überhaupt erst entstanden. Auch während meiner Doktorarbeit hat sie mich immer unterstützt und hatte stets ein offenes Ohr.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Werner Falk und Dr. Philipp Gross für die Bereitstellung des TLR4/MD-2 Fusionsproteins und die Hilfe bei den Versuchen.

Bei Dr. med. Frank Hanses möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung und Geduld bei den Tierversuchen bedanken.

Bei PD Dr. Reiner Wiest und Franz Leidl möchte ich mich für die Sammlung und Bereitstellung der Aszitesproben bedanken.

Vielen Dank an Dr. med. Margarita Bala für die große Hilfe beim Aufbau des Diabetiker-Kollektivs. Danke auch für die schöne Zeit im Labor und die Reisebegleitung.

Bei meinen beiden Laborkolleginnen Kerstin Neumeier und Carina Heinrich möchte ich mich tausendmal für die große Hilfe und Unterstützung, gerade in der heißen Phase meiner Arbeit

bedanken. Ihr musstet Vieles mitmachen und habt mich immer versucht, wieder zu beruhigen, wenn Alles zu viel wurde.

Besonderen Dank nochmal an Kerstin, die mich in ihr Labor aufgenommen und eingewiesen hat. Schnell hat sich aus unseren Plaudereien eine wichtige Freundschaft entwickelt!

Vielen Dank auch an meine Kolleginnen und Kollegen aus dem H4: Sabrina Bauer (Dir besonders! Du hast mir sehr viel geholfen!), Yvonne Hader, Tanja Späth, Josef Wanninger, Thomas Karrasch, Kristina Eisinger, Roland Walter und allen, die während der letzten Jahre als Praktikanten und Diplomanden im Labor waren. Es war immer wieder nett, im Rahmen des Entwickelns bei Euch vorbeizuschauen. Danke für die große Unterstützung in allen Dingen.

Natürlich auch ein großes Dankeschön an meine ehemaligen Kollegen Dr. Johanna Weigert und Dr. Markus Neumeier. Ihr habt mir mit vielen Tipps und Hilfestellungen immer unheimlich weitergeholfen.

Bei Markus möchte ich mich nochmal gesondert für die Freundschaft und seine wahnsinnige Hilfsbereitschaft bedanken!

Bib-Andrea ;-) sagt auch Danke für die Aufnahme in die kleine Neumeier-Familie als Patin von Jakob!

Danke an meine Freunde, vor allem an Vera, für den Beistand während der Arbeit.

Vielen Dank auch an meine beste Freundin Stucki. Das Korrekturlesen war bitternötig und hat mir viel geholfen. Meine niemals versiegende Quelle für gesunde Nahrung war in den letzten Monaten sehr wichtig!

Meiner Schwester Daniela sage ich vielen Dank fürs Zuhören, Dasein und vor allem für die beiden wertvollsten Geschenke, die es gibt: Mia und Sina. Jeder Besuch bei Euch hat mir geholfen neue Kraft zu tanken.

Am allermeisten möchte ich aber meinen Eltern Anna und Josef danken. Ihr habt mich immer unterstützt, habt mit mir mitgelitten, wenn es stressig war und wart immer und jederzeit für mich da. Ihr habt mir zugehört und mir immer wieder von neuem Mut gemacht. Das war mir eine unglaubliche Hilfe und dafür möchte ich Euch von ganzem Herzen danken!

Diese Arbeit wurde mit der finanziellen Unterstützung der DFG (SCHA 789/4-1, SCHA 789/4-2 und SCHA 789/5-1) durchgeführt.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der obigen Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Regensburg, den 02.02.2011

Andrea Kopp

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Bluher, M., *The distinction of metabolically 'healthy' from 'unhealthy' obese individuals*. Curr Opin Lipidol, 2010. **21**(1): p. 38-43.
2. Bluher, M., *Adipose tissue dysfunction in obesity*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2009. **117**(6): p. 241-50.
3. Gelsinger, C., et al., *[Adipokine update - new molecules, new functions]*. Wien Med Wochenschr, 2010. **160**(15-16): p. 377-90.
4. Gustafson, B., *Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis*. J Atheroscler Thromb, 2010. **17**(4): p. 332-41.
5. Moller, D.E. and K.D. Kaufman, *Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective*. Annu Rev Med, 2005. **56**: p. 45-62.
6. Richard, D. and F. Picard, *Brown fat biology and thermogenesis*. Front Biosci, 2011. **16**: p. 1233-60.
7. Armani, A., et al., *Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity*. J Cell Biochem, 2010. **110**(3): p. 564-72.
8. Trayhurn, P., *Adipocyte biology*. Obes Rev, 2007. **8 Suppl 1**: p. 41-4.
9. Nedungadi, T.P. and D.J. Clegg, *Sexual dimorphism in body fat distribution and risk for cardiovascular diseases*. J Cardiovasc Transl Res, 2009. **2**(3): p. 321-7.
10. Geer, E.B. and W. Shen, *Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance*. Gend Med, 2009. **6 Suppl 1**: p. 60-75.
11. Lafontan, M. and M. Berlan, *Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights?* Trends Pharmacol Sci, 2003. **24**(6): p. 276-83.
12. Hamdy, O., S. Porramatikul, and E. Al-Ozairi, *Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat*. Curr Diabetes Rev, 2006. **2**(4): p. 367-73.
13. Berg, A.H. and P.E. Scherer, *Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease*. Circ Res, 2005. **96**(9): p. 939-49.
14. Schaffler, A. and C. Buchler, *Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies*. Stem Cells, 2007. **25**(4): p. 818-27.
15. Greenberg, A.S. and M.S. Obin, *Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(2): p. 461S-465S.
16. Kershaw, E.E. and J.S. Flier, *Adipose tissue as an endocrine organ*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2548-56.

17. Rabe, K., et al., *Adipokines and insulin resistance*. Mol Med, 2008. **14**(11-12): p. 741-51.
18. Chandran, M., et al., *Adiponectin: more than just another fat cell hormone?* Diabetes Care, 2003. **26**(8): p. 2442-50.
19. Spalding, K.L., et al., *Dynamics of fat cell turnover in humans*. Nature, 2008. **453**(7196): p. 783-7.
20. Dandona, P., A. Aljada, and A. Bandyopadhyay, *Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes*. Trends Immunol, 2004. **25**(1): p. 4-7.
21. Gallagher, E.J., D. LeRoith, and E. Karnieli, *Insulin Resistance in Obesity as the Underlying Cause for the Metabolic Syndrome*. Mount Sinai Journal of Medicine, 2010. **77**(5): p. 511-523.
22. Retnakaran, R., et al., *C-reactive protein and gestational diabetes: the central role of maternal obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(8): p. 3507-12.
23. Fain, J.N., et al., *Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans*. Endocrinology, 2004. **145**(5): p. 2273-82.
24. Visser, M., et al., *Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults*. JAMA, 1999. **282**(22): p. 2131-5.
25. Lohsoonthorn, V., B. Dhanamun, and M.A. Williams, *Prevalence of metabolic syndrome and its relationship to white blood cell count in a population of Thai men and women receiving routine health examinations*. Am J Hypertens, 2006. **19**(4): p. 339-45.
26. Davis, J.E., et al., *Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(6): p. 1248-55.
27. Kanda, H., et al., *MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity*. J Clin Invest, 2006. **116**(6): p. 1494-505.
28. Weisberg, S.P., et al., *CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding*. J Clin Invest, 2006. **116**(1): p. 115-24.
29. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
30. Sethi, J.K. and G.S. Hotamisligil, *The role of TNF alpha in adipocyte metabolism*. Semin Cell Dev Biol, 1999. **10**(1): p. 19-29.
31. Kopp, A., et al., *Toll-like receptor ligands cause proinflammatory and prodiabetic activation of adipocytes via phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase but not interferon regulatory factor-3*. Endocrinology, 2010. **151**(3): p. 1097-108.

-
32. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Inflammation, stress, and diabetes*. J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1111-9.
 33. Ozcan, U., et al., *Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes*. Science, 2004. **306**(5695): p. 457-61.
 34. Lin, Y., et al., *The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 4617-26.
 35. Zick, Y., *Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(11): p. 437-41.
 36. Konner, A.C. and J.C. Bruning, *Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2010.
 37. Lin, Y., et al., *The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes*. J Biol Chem, 2000. **275**(32): p. 24255-63.
 38. Pietsch, J., et al., *Toll-like receptor expression and response to specific stimulation in adipocytes and preadipocytes: on the role of fat in inflammation*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1072**: p. 407-9.
 39. Kopp, A., et al., *Innate immunity and adipocyte function: ligand-specific activation of multiple Toll-like receptors modulates cytokine, adipokine, and chemokine secretion in adipocytes*. Obesity (Silver Spring), 2009. **17**(4): p. 648-56.
 40. Schaeffler, A., et al., *Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity*. Immunology, 2009. **126**(2): p. 233-45.
 41. Suganami, T., et al., *Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(1): p. 84-91.
 42. Shi, H., et al., *TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance*. J Clin Invest, 2006. **116**(11): p. 3015-25.
 43. Batra, A., et al., *Leptin-dependent toll-like receptor expression and responsiveness in preadipocytes and adipocytes*. Am J Pathol, 2007. **170**(6): p. 1931-41.
 44. Kishore, U., et al., *Clq and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility*. Trends Immunol, 2004. **25**(10): p. 551-61.
 45. Kojouharova, M., K. Reid, and M. Gadjeva, *New insights into the molecular mechanisms of classical complement activation*. Mol Immunol, 2010. **47**(13): p. 2154-60.
 46. Kishore, U. and K.B. Reid, *Modular organization of proteins containing Clq-like globular domain*. Immunopharmacology, 1999. **42**(1-3): p. 15-21.

47. Shapiro, L. and P.E. Scherer, *The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor*. Curr Biol, 1998. **8**(6): p. 335-8.
48. Hu, E., P. Liang, and B.M. Spiegelman, *AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity*. J Biol Chem, 1996. **271**(18): p. 10697-703.
49. Maeda, K., et al., *cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **221**(2): p. 286-9.
50. Nakano, Y., et al., *Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma*. J Biochem, 1996. **120**(4): p. 803-12.
51. Scherer, P.E., et al., *A novel serum protein similar to Clq, produced exclusively in adipocytes*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26746-9.
52. Neumeier, M., et al., *Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(4): p. 803-8.
53. Wiecek, A., M. Adamczak, and J. Chudek, *Adiponectin--an adipokine with unique metabolic properties*. Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(4): p. 981-8.
54. Arita, Y., et al., *Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **257**(1): p. 79-83.
55. Hotta, K., et al., *Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys*. Diabetes, 2001. **50**(5): p. 1126-33.
56. Cui, J., S. Panse, and B. Falkner, *The role of adiponectin in metabolic and vascular disease: a review*. Clin Nephrol, 2011. **75**(1): p. 26-33.
57. Whitehead, J.P., et al., *Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome*. Diabetes Obes Metab, 2006. **8**(3): p. 264-80.
58. Weyer, C., et al., *Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(5): p. 1930-5.
59. Maeda, N., et al., *PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein*. Diabetes, 2001. **50**(9): p. 2094-9.
60. Hug, C., et al., *T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(28): p. 10308-13.
61. Fasshauer, M., et al., *Growth hormone is a positive regulator of adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes*. FEBS Lett, 2004. **558**(1-3): p. 27-32.
62. Kharroubi, I., et al., *Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **312**(4): p. 1118-22.

-
63. Chinetti, G., et al., *Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **314**(1): p. 151-8.
 64. Schaffler, A., J. Scholmerich, and C. Buchler, *Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in intestinal and mesenteric diseases*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2005. **2**(2): p. 103-11.
 65. Yamauchi, T., et al., *Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions*. Nat Med, 2007. **13**(3): p. 332-9.
 66. Kadowaki, T. and T. Yamauchi, *Adiponectin and adiponectin receptors*. Endocr Rev, 2005. **26**(3): p. 439-51.
 67. Trujillo, M.E. and P.E. Scherer, *Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome*. J Intern Med, 2005. **257**(2): p. 167-75.
 68. Ryo, M., et al., *Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome*. Circ J, 2004. **68**(11): p. 975-81.
 69. Schulze, M.B., et al., *Relationship between adiponectin and glycemic control, blood lipids, and inflammatory markers in men with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2004. **27**(7): p. 1680-7.
 70. Xu, A., et al., *The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice*. J Clin Invest, 2003. **112**(1): p. 91-100.
 71. Kamada, Y., et al., *Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin*. Gastroenterology, 2003. **125**(6): p. 1796-807.
 72. Lopez-Bermejo, A., et al., *Adiponectin, hepatocellular dysfunction and insulin sensitivity*. Clin Endocrinol (Oxf), 2004. **60**(2): p. 256-63.
 73. Hui, J.M., et al., *Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin?* Hepatology, 2004. **40**(1): p. 46-54.
 74. Yokota, T., et al., *Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages*. Blood, 2000. **96**(5): p. 1723-32.
 75. Ouchi, N., et al., *Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin*. Circulation, 1999. **100**(25): p. 2473-6.
 76. Wong, G.W., et al., *A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(28): p. 10302-7.
 77. Wong, G.W., et al., *Molecular, biochemical and functional characterizations of C1q/TNF family members: adipose-tissue-selective expression patterns, regulation by PPAR-gamma agonist, cysteine-mediated oligomerizations, combinatorial associations and metabolic functions*. Biochem J, 2008. **416**(2): p. 161-77.

-
78. Kim, K.Y., et al., *Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta increases CTRP1 expression in adipose tissue*. FEBS Lett, 2006. **580**(16): p. 3953-60.
 79. Jeon, J.H., et al., *A novel adipokine CTRP1 stimulates aldosterone production*. FASEB J, 2008. **22**(5): p. 1502-11.
 80. Park, S.Y., et al., *Clq tumor necrosis factor alpha-related protein isoform 5 is increased in mitochondrial DNA-depleted myocytes and activates AMP-activated protein kinase*. J Biol Chem, 2009. **284**(41): p. 27780-9.
 81. Kim, M.J., et al., *ClqTNF-related protein-6 increases the expression of interleukin-10 in macrophages*. Mol Cells, 2010. **30**(1): p. 59-64.
 82. Lee, W., et al., *ClqTNF-related protein-6 mediates fatty acid oxidation via the activation of the AMP-activated protein kinase*. FEBS Lett, 2010. **584**(5): p. 968-72.
 83. Wong, G.W., et al., *Identification and characterization of CTRP9, a novel secreted glycoprotein, from adipose tissue that reduces serum glucose in mice and forms heterotrimers with adiponectin*. FASEB J, 2009. **23**(1): p. 241-58.
 84. Maeda, T., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel gene, CORS26, encoding a putative secretory protein and its possible involvement in skeletal development*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3628-34.
 85. Schaffler, A., et al., *Genomic organization, promoter, amino acid sequence, chromosomal localization, and expression of the human gene for CORS-26 (collagenous repeat-containing sequence of 26-kDa protein)*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1630**(2-3): p. 123-9.
 86. Maeda, T., et al., *Cartducin, a paralog of Acrp30/adiponectin, is induced during chondrogenic differentiation and promotes proliferation of chondrogenic precursors and chondrocytes*. J Cell Physiol, 2006. **206**(2): p. 537-44.
 87. Schaffler, A., et al., *Regulation and function of collagenous repeat containing sequence of 26-kDa protein gene product "cartonectin"*. Obesity (Silver Spring), 2007. **15**(2): p. 303-13.
 88. Schaffler, A., et al., *Genomic organization, chromosomal localization and adipocytic expression of the murine gene for CORS-26 (collagenous repeat-containing sequence of 26 kDa protein)*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1628**(1): p. 64-70.
 89. Weigert, J., et al., *The adiponectin paralog CORS-26 has anti-inflammatory properties and is produced by human monocytic cells*. FEBS Lett, 2005. **579**(25): p. 5565-70.
 90. Wurm, S., et al., *Plasma levels of leptin, omentin, collagenous repeat-containing sequence of 26-kDa protein (CORS-26) and adiponectin before and after oral glucose uptake in slim adults*. Cardiovasc Diabetol, 2007. **6**: p. 7.
 91. Peterson, J.M., Z. Wei, and G.W. Wong, *Clq/TNF-related protein-3 (CTRP3): a novel adipokine that regulates hepatic glucose output*. J Biol Chem, 2010.

-
92. Akiyama, H., et al., *Cartducin stimulates mesenchymal chondroprogenitor cell proliferation through both extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways*. FEBS J, 2006. **273**(10): p. 2257-63.
 93. Maeda, T. and S. Wakisaka, *CTRP3/cartducin is induced by transforming growth factor-beta1 and promotes vascular smooth muscle cell proliferation*. Cell Biol Int, 2010. **34**(3): p. 261-6.
 94. Akiyama, H., et al., *CTRP3/cartducin promotes proliferation and migration of endothelial cells*. Mol Cell Biochem, 2007. **304**(1-2): p. 243-8.
 95. Akiyama, H., et al., *Elevated expression of CTRP3/cartducin contributes to promotion of osteosarcoma cell proliferation*. Oncol Rep, 2009. **21**(6): p. 1477-81.
 96. Shoelson, S.E., J. Lee, and A.B. Goldfine, *Inflammation and insulin resistance*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1793-801.
 97. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
 98. Heukeshoven, J. and R. Dernick, *Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels*. Electrophoresis, 1988. **9**(1): p. 28-32.
 99. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. 1979. Biotechnology, 1992. **24**: p. 145-9.
 100. Wiest, R., et al., *Peritoneal fluid adipokines: ready for prime time?* Eur J Clin Invest, 2009. **39**(3): p. 219-29.
 101. Green, H. and M. Meuth, *An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture*. Cell, 1974. **3**(2): p. 127-33.
 102. Ntambi, J.M. and K. Young-Cheul, *Adipocyte differentiation and gene expression*. J Nutr, 2000. **130**(12): p. 3122S-3126S.
 103. Birnboim, H.C., *A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA*. Methods Enzymol, 1983. **100**: p. 243-55.
 104. Knippers, R., ed. *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag. 2001: Stuttgart.
 105. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
 106. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
 107. Mello, C.C. and D. Conte, Jr., *Revealing the world of RNA interference*. Nature, 2004. **431**(7006): p. 338-42.
 108. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.

-
109. Gross, P., *Modulation der Immunantwort in der mikrobiellen Sepsis durch lösliche Toll-like Rezeptoren*, in *Fakultät IV - Chemie und Pharmazie*. 2009, Universität Regensburg: Regensburg.
 110. Green, H. and O. Kehinde, *An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion*. *Cell*, 1975. **5**(1): p. 19-27.
 111. Madigan, M., Parker, ed. *Brock Mikrobiologie*. 2003, Spektrum Akademischer Verlag: Berlin.
 112. Lee, J.Y., et al., *Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(20): p. 16683-9.
 113. Kaisho, T. and S. Akira, *Toll-like receptors as adjuvant receptors*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1589**(1): p. 1-13.
 114. Brasaemle, D.L., *Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis*. *J Lipid Res*, 2007. **48**(12): p. 2547-59.
 115. Pan, D.A., et al., *Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action*. *Diabetes*, 1997. **46**(6): p. 983-8.
 116. Krssak, M., et al., *Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a 1H NMR spectroscopy study*. *Diabetologia*, 1999. **42**(1): p. 113-6.
 117. Meex, R.C., P. Schrauwen, and M.K. Hesselink, *Modulation of myocellular fat stores: lipid droplet dynamics in health and disease*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009. **297**(4): p. R913-24.
 118. Peake, P.W., et al., *Human adiponectin binds to bacterial lipopolysaccharide*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **341**(1): p. 108-15.
 119. Hol, J., L. Wilhelmsen, and G. Haraldsen, *The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies*. *J Leukoc Biol*, 2010. **87**(3): p. 501-8.
 120. Schaffler, A. and J. Scholmerich, *Innate immunity and adipose tissue biology*. *Trends Immunol*, 2010. **31**(6): p. 228-35.
 121. Gu, L., et al., *Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice*. *Mol Cell*, 1998. **2**(2): p. 275-81.
 122. Korner, A., et al., *Adiponectin expression in humans is dependent on differentiation of adipocytes and down-regulated by humoral serum components of high molecular weight*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **337**(2): p. 540-50.
 123. Schaffler, A., et al., *Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases*. *Endocr Rev*, 2006. **27**(5): p. 449-67.

-
124. Schaffler, A., J. Scholmerich, and C. Buchler, *Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in nonalcoholic fatty liver disease*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2005. **2**(6): p. 273-80.
125. Fisher, F.M., et al., *Differences in adiponectin protein expression: effect of fat depots and type 2 diabetic status*. Horm Metab Res, 2002. **34**(11-12): p. 650-4.
126. Liu, Q., et al., *Activation of AMP-activated protein kinase signaling pathway by adiponectin and insulin in mouse adipocytes: requirement of acyl-CoA synthetases FATP1 and Acs11 and association with an elevation in AMP/ATP ratio*. FASEB J, 2010. **24**(11): p. 4229-39.
127. Wulster-Radcliffe, M.C., et al., *Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **316**(3): p. 924-9.
128. Suganami, T., et al., *Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **354**(1): p. 45-9.
129. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
130. Inouye, K.E., et al., *Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue*. Diabetes, 2007. **56**(9): p. 2242-50.
131. Kirk, E.A., et al., *Monocyte chemoattractant protein deficiency fails to restrain macrophage infiltration into adipose tissue [corrected]*. Diabetes, 2008. **57**(5): p. 1254-61.
132. Chung, S., et al., *Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes*. Endocrinology, 2006. **147**(11): p. 5340-51.
133. Compton, S.A. and B. Cheatham, *CTRP-3: blocking a toll booth to obesity-related inflammation*. Endocrinology, 2010. **151**(11): p. 5095-7.
134. Pietilainen, K.H., et al., *Acquired obesity increases CD68 and tumor necrosis factor-alpha and decreases adiponectin gene expression in adipose tissue: a study in monozygotic twins*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(7): p. 2776-81.
135. Zuniga, L.A., et al., *IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity*. J Immunol, 2010. **185**(11): p. 6947-59.
136. Ohsumi, J., et al., *Troglitazone prevents the inhibitory effects of inflammatory cytokines on insulin-induced adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells*. Endocrinology, 1994. **135**(5): p. 2279-82.
137. Ruan, H., et al., *Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory*. Diabetes, 2002. **51**(5): p. 1319-36.

-
138. Baumgart, M., et al., *Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive Escherichia coli of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum*. ISME J, 2007. **1**(5): p. 403-18.